



# **El extracto acuoso de lombricomposta: Generalidades, caracterización y potencial alternativa para el control biológico de *Hemileia vastatrix***

TESIS QUE PRESENTA EDUARDO HERNÁNDEZ H.

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS.

Xalapa, Veracruz, México 2019

---

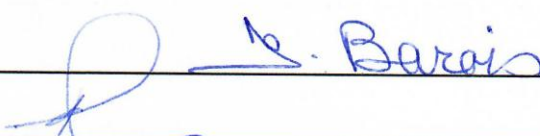
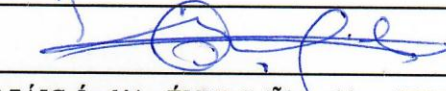
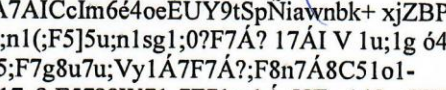
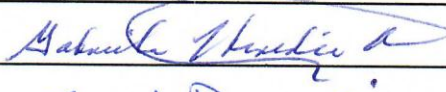
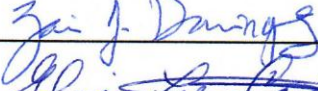
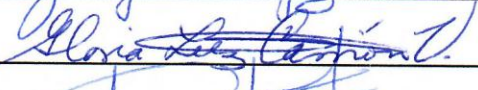





## Aprobación final del documento de tesis de grado:

Título de la tesis en comillas:

“El extracto acuoso de lombricomposta: Generalidades, caracterización y potencial alternativa para el control biológico de *Hemileia vastatrix*”

	Nombre	Firma
Directora	Dra. Isabelle Françoise Barois Boullard	
Co-Director	Dr. Enrique Alarcón Gutiérrez	
Comité Tutorial	Dr. José Antonio Guerrero Analco	
	Dr. Jacques Avelino	0HáVÓA7ÁICcím6é4oeÉUY9tSpÑiawnbk+ xjZBP;vsDgsul7Fu 1(;F5]5u;n1(;F5]5u;n1sg1;0?F7Á? 17ÁI V 1u;lg 64F8Á 6- V?7z1c;5;F7g8u7u;Vy1Á7F7Á?;F8n7Á8C51ol- ?;5Á87g17g?;F57?8W71-7F71;g1Á 5?F g148 gCT8Á 1u;1(;68g;871W7V?7?F801UFp1P7ÁwI;V1üW;g85 1j 51N;41LL1L+záLzáÚ1b)L+;2GWR(l?úM)NQzy.[5EÜdTqL,:K36OXrñfu iÜ1üFhJ]-
Jurado	Dra. Gabriela Patricia Heredia Abarca	
	Dra. Zaira Julieta Domínguez	
	Dra. Gloria Luz Carrión Villanova	
	Dr. José Antonio García Pérez	



## **Reconocimientos**

Al CONACyT por la beca otorgada para llevar a cabo realizar los estudios de posgrado.

Al Instituto de Ecología, A. C., por el apoyo organizacional y por abrir sus puertas.

Al Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada de la Universidad Veracruzana por el apoyo del uso de áreas de trabajo y equipos de medición de enzimas y procesamiento de materia orgánica.

Al comité tutorial por sus enseñanzas en materia de estructuración de textos, redacción y presentación de resultados: Dra. Isabelle Barois Boullard, Dr. Enrique Alarcón Gutiérrez, Dr. Antonio Guerrero Analco y Dr. Jacques Avelino.

Al personal de Inecol involucrado en los trabajos de investigación reportados en esta tesis y que también son explícitamente mencionados en las secciones respectivas: Dra. Gabriela Heredia, Dr. Juan Luis Monribot Villanueva, Dra. Ofelia Ferrera Rodríguez, M. en C. Sandra Rocha, QFB. Ángel Sahid Aguilar Colorado y Tiburcio Aponte.

Al Dr. Óscar Briones por el préstamo del equipo para medir temperatura y humedad relativa de forma automática.

A los profesionistas que se involucraron como estudiantes en este proyecto para el desarrollo de experimentos y pruebas de laboratorio: Biól. Marycruz Álvarez Jiménez e Ing. Alma Rodríguez de la Universidad Veracruzana.

A Don Miguel Álvarez Hernández, ejidatario de “La Finca” de donde se obtuvo la mayor cantidad de esporas de roya para las pruebas de germinación.



## **Dedicaciones**

Naturalmente, **a mi familia**, las personas que me han formado, apoyado y amado de forma incondicional.

**A mi prometida**, Marycruz Álvarez, quien comparte conmigo el gusto por estudiar la vida, la química, la ecología, el mundo microscópico y me contagia inexorablemente con su buen ánimo y visión optimista del porvenir.

**A mi hermano**, Christian A. Hernández, mi investigador SNI personal que, a pesar de sus nuevas y pesadas ocupaciones, siempre encuentra un espacio para aconsejarme en mis diseños experimentales, redacción y esfuerzos metodológicos.

**A mis padres**, Diana e Ismael, cuyos aciertos me enseñaron mucho y cuyos errores me han enseñado más.

Así, esta tesis es para Ustedes, sin quienes no habría llegado a este momento, a este grado y a este posgrado.





## DECLARACIÓN


Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en esta tesis fue efectuado por Eduardo Hernández Hernández como estudiante de la carrera de Maestro en Ciencias entre Septiembre de 2015 y Febrero del 2019, bajo la supervisión de la Dra. Isabella Barois Boullard.

Las investigaciones reportadas en esta tesis no han sido utilizadas anteriormente para obtener otros grados académicos, ni serán utilizadas para tales fines en el futuro.

Candidato: Eduardo Hernández Hernández



Director de tesis: Dra. Isabelle Barois Boullard





# Índice

1. Introducción general .....	19
1.1. Marco teórico .....	<b>19</b>
1.1.1 El cultivo de café.....	<b>21</b>
1.1.1.1 <i>Hemileia vastatrix</i> , agente causal de la roya del café .....	<b>22</b>
1.1.1.2 Ciclo de vida de <i>Hemileia vastatrix</i> Berkeley & Broome.....	<b>23</b>
1.1.2 Extracto acuoso de lombricomposta (ExLom).....	<b>26</b>
1.1.2.1 Actividad antifúngica del extracto acuoso .....	<b>26</b>
1.1.2.1.1 Microorganismos en el extracto .....	<b>27</b>
1.1.2.1.2 Las quitinasas y su efecto en el control de hongos fitopatógenos.....	<b>27</b>
1.1.2.2 Nutrientes minerales en ExLom.....	<b>28</b>
1.1.2.3 Promotores de defensa metabólica.....	<b>29</b>
1.1.2.4 Los compuestos fenólicos y el control de enfermedades fúngicas .....	<b>29</b>
1.2. Justificación.....	<b>29</b>
1.3. Preguntas de investigación.....	<b>30</b>
1.4. Hipótesis de investigación.....	<b>30</b>
1.5. Objetivos de investigación .....	<b>30</b>
Referencias .....	<b>32</b>
2. Capítulo 1: Production and uses of high quality compost and vermicompost watery extracts .....	37
2.2. Introduction .....	<b>37</b>
2.3. Production methods.....	<b>38</b>
2.4. Compost extract production method .....	<b>40</b>
2.5. Quality .....	<b>44</b>
2.6. Applications .....	<b>45</b>
2.7. Adverse effects.....	<b>47</b>
2.8. Conclusions .....	<b>50</b>

2.9. Acknowledgements .....	50
2.10. References .....	50
3. Capítulo 2. Estandarización de la obtención y caracterización de un extracto acuoso de lombricomposta a base de pulpa de café: Efecto en la germinación de esporas <i>Hemileia vastatrix</i> .....	57
3.1. Resumen.....	57
3.2. Introducción .....	57
3.3. Materiales y métodos .....	62
3.4. Análisis estadísticos .....	79
3.5. Resultados .....	80
3.6. Discusión.....	92
3.7. Conclusiones .....	99
3.8. Agradecimientos.....	100
3.9. Referencias .....	100
4. Capítulo 3. Disminución del daño foliar ocasionado por roya del café ( <i>Hemileia vastatrix</i> ) a través de la aplicación de extracto acuoso de lombricomposta .....	111
4.1. Resumen.....	111
4.2. Introducción .....	111
4.3. Materiales y métodos .....	113
4.4. Análisis estadísticos .....	118
4.5. Resultados .....	119
4.6. Discusión.....	125
4.7. Conclusiones .....	128
4.8. Agradecimientos.....	128
4.9. Referencias .....	129
5. Conclusiones generales.....	135
6. Perspectivas.....	135

## Lista de cuadros y figuras

### *Lista de cuadros*

#### **Capítulo 1.**

**Cuadro 1.1.** Macro y micronutrientes de diferentes extractos acuosos de composta o lombricomposta ( $\text{g L}^{-1}$ ).

**Cuadro 1.2.** Diferentes métodos de obtener extracto de composta o lombricomposta de acuerdo a diversos autores y sus resultados.

**Cuadro 1.3.** Relación entre el factor de dilución entre extractos de composta y el efecto fitotóxico.

#### **Capítulo 2.**

**Cuadro 2.1.** Diseño experimental del primer cultivo de lombrices para producción de lombricomposta.

**Cuadro 2.2.** Diseño experimental de segundo cultivo de lombrices para producción de lombricomposta.

**Cuadro 2.3.** Diseño experimental de experimento de selección del método óptimo de extracción para disminuir la germinación de las esporas de roya del café.

**Cuadro 2.4.** Diseño experimental que garantiza la esterilidad a través del método de filtración.

**Cuadro 2.5.** Diseño experimental de la evaluación del efecto de la fracción microbiológica en la disminución de la germinación de esporas de roya del café.

**Cuadro 2.6.** Perfiles de elución según tiempo de cromatografía.

**Cuadro 2.7.** Compuestos fenólicos cuantificados a través de un estudio dirigido en ExLom-P.

**Cuadro 2.8.** Rango de cuantificación de compuestos fenólicos en ExLom-P y el coeficiente de determinación.

**Cuadro 2.9.** Nutrientes presentes en el extractos no aireado de lombricomposta ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

**Cuadro 2.10.** Inductores de respuesta sistémica (RSI) y compuestos fenólicos detectados en el ExLom-P identificados inequívocamente a través de UPLC en un estudio dirigido.

**Cuadro 2.11.** Compuestos del ExLom-P identificados tentativamente a través de UPLC en un estudio no-dirigido.

**Cuadro 2.12.** Comparación de la actividad de la enzima quitinasa obtenida en el presente trabajo (con y sin adición de PCJ), con la del estudio de El-Masry *et al.*, (2002).

### **Capítulo 3.**

**Cuadro 3.1.** Diseño de etapa de lombricompostaje para mantener independencia de resultados.

**Cuadro 3.2.** Primer experimento en condiciones de invernadero que verifica el efecto de agregar un nutriente complementario a la lombricomposta en el daño foliar de la roya del café.

**Cuadro 3.3.** Resumen del diseño del segundo experimento en condiciones de invernadero que verifica el efecto de remover los microorganismos del extracto y dar tratamiento a diferentes momentos en relación con la deposición de esporas en el daño foliar de la roya del café.

**Cuadro 3.4.** Hojas lesionadas durante el primer experimento *in vivo*.

**Cuadro 3.5.** Hojas lesionadas durante el segundo experimento *in vivo*.

**Cuadro 3.6.** Control biológico de algunos patógenos a través de la aplicación de extracto de composta y lombricomposta.

### *Lista de figuras*

#### **Introducción**

**Figura 0.1.** Árbol de problemas de *H. vastatrix*.

**Figura 0.2.** Dispersión global de la roya del café a través de la historia

**Figura 0.3.** Soros o pústulas de *H. vastatrix*, confieren la característica distintiva de la enfermedad. Localidad: El Palmar, Veracruz, México.

**Figura 0.4.** Ciclo de vida de *H. vastatrix*. La fotografía de clorosis corresponde a los experimentos controlados en invernadero.

#### **Capítulo 2.**

**Figura 2.1.** Caparazones de quitina utilizados como nutriente suplementario en la etapa de lombricompostaje. Foto: Marycruz Álvarez J.

**Figura 2.2.** Esquema de las unidades experimentales utilizadas durante la etapa de lombricompostaje.

**Figura 2.3.** A la izquierda se muestra una espora de roya germinada. Su contraparte, la espora no-germinada se muestra a la derecha.

**Figura 2.4.** Diagrama de flujo de extracción de compuestos de lombricomposta y preparación de muestras para análisis en UPLC en el estudio dirigido y no-dirigido.

**Figura 2.5.** Índice de supervivencia de cultivo de lombrices con una densidad poblacional de 29,000 individuos m<sup>2</sup> expuestas a cuatro diferentes niveles de PCJ.

**Figura 2.6.** Supresión de la germinación de esporas de roya al exponerlas a ExLom-P (sin adición de PCJ) derivado de tres métodos: aireado, no-aireado y decocción.

**Figura 2.7.** Efecto de microorganismos en la disminución de la germinación de la roya.

**Figura 2.8.** Inoculación de agar Müeller-Hinton con ExLom-P crudo (no filtrado; A, B, C) y estéril (filtrado; D, E, F) tras siete días de cultivo.

**Figura 2.9.** Fotografía a través de microscopio electrónico de barrido. Germinación de esporas en agua y ExLom-P sin PCJ.

**Figura 2.10.** Fotografía a través de microscopio electrónico de barrido. Germinación de esporas en ExLom-P con uno y tres gramos de PCJ.

### Capítulo 3.

**Figura 3.1.** Hojas de café infectadas por *H. vastatrix*. Ubicación Emiliano Zapata, localidad El Palmar. Foto: Eduardo Hernández H.

**Figura 3.2.** Instalación del experimento en invernadero 3 del Jardín Botánico “Francisco Javier Clavijero”.

**Figura 3.3.** Disminución del daño foliar de *H. vastatrix* en plantas de café después de la aplicación de ExLom-P.

**Figura 3.4.** Daño foliar en café (13 hojas por unidad experimental) causado por *H. vastatrix* después de la aplicación de ExLom-P crudo y ExLom-P esterilizado a través de microfiltros (poro de 0.2 µm).





## Resumen general

El extracto de lombricomposta (ExLom), es una solución acuosa que destaca por la disminución del daño a plantas causado por algunas enfermedades fúngicas. Así, el ExLom podría ser una alternativa potencial para el control del hongo patógeno *Hemileia vastatrix* que conlleva a la pérdida de valor de los cafetales de sombra. Por tanto, el problema abordado en el capítulo 1 fue que el entendimiento científico actual del ExLom aún es insuficiente para promover su uso como alternativa de control biológico. Así, a través de la revisión bibliográfica, se encontró que la materia orgánica más disponible regionalmente es la más recomendable para realizar compostaje y lombricompostaje así como sus ExLoms. Por su parte, los procesos de extracción acuosa más exitosos en el control de enfermedades han sido el aireado (EXT-A) y no aireado (EXT-NA). También se determinó que el estudio de sus características bioquímicas permite esclarecer las aplicaciones potenciales del ExLom. El capítulo 2 determinó si el ExLom tenía efecto en la disminución de la germinación de esporas de la roya del café e identificó la relevancia de la fracción microbiana en esta variable. Así, con el objetivo de estandarizar su obtención, se describe a detalle el proceso de producción de un ExLom producido a partir de pulpa de café (ExLom-P). Adicionalmente, para mejorar potencialmente el efecto de control biológico al aumentar la actividad de la enzima quitinas, se adicionó polvo de caparazón de jaiba (PCJ) como fuente de quitina al lombricompostaje. Se observó que la adición de PCJ no tuvo efectos en la germinación de esporas; que, tanto el EXT-A como el EXT-NA, disminuyeron la germinación de esporas sin diferencias entre sí y que, al esterilizar el ExLom-P, el efecto de disminución de germinación desapareció. Por tanto, se tuvo al ExLom-P crudo, sin PCJ y producido a través de EXT-NA, como la mejor opción para continuar las pruebas. Con esta evidencia, se planteó si el ExLom-P disminuiría el daño foliar ocasionado por *H. vastatrix* en plantas de café. Entonces, el capítulo 3 describe ensayos *in vivo* en condiciones de invernadero en donde se probó el ExLom-P crudo y estéril derivados de lombricomposta enriquecida con PCJ. Se encontró que la aplicación del ExLom-P disminuyó el daño foliar de la roya del café y que el enriquecimiento con PCJ tampoco tuvo efectos significativos en esta variable. Estos resultados indican que la pulpa de café puede proponerse como materia prima para la producción de lombricomposta y ExLom-P para usarse como control alternativo de la roya del café al tiempo que sustituye a los antifúngicos químicos.



## 1. Introducción general

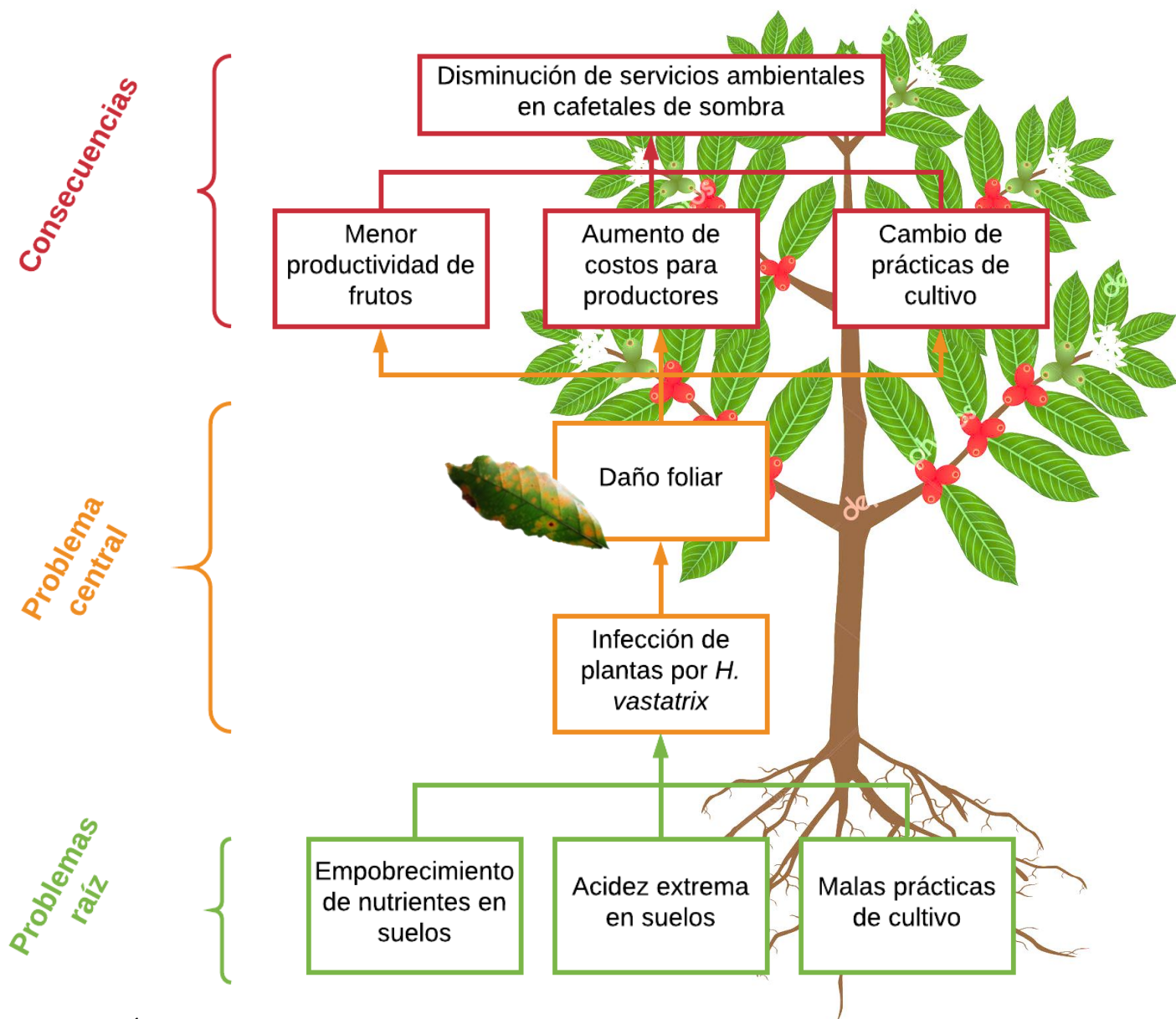
### 1.1. Marco teórico

Los cafetales de sombra son uno de los agroecosistemas de mayor valor económico y ecosistémico en México (Food and Agriculture Organization [FAO], 2015). Sin embargo, debido a las condiciones climatológicas y patrones de cultivo en los cafetales de sombra, la proliferación de roya del café ocasionada por el hongo *Hemileia vastatrix* ha ido en aumento disminuyendo la productividad de los cafetales; ejerciendo una presión negativa en términos ecológicos y económicos (Figura 0.1).

En este contexto, se requiere de alternativas naturales y de bajo costo que disminuyan la incidencia de *H. vastatrix* y el daño foliar causado a *Coffea arabica* var. *typica*. Una alternativa que podría coadyuvar a la resolución de esta problemática es el uso del extracto acuoso de lombricomposta (ExLom) ya que, según reportes recientes, el extracto disminuye el daño causado por enfermedades fúngicas en plantas. Sin embargo, se ignora si este efecto se debe a la cantidad y/o diversidad de microorganismos presentes en el extracto, a la actividad de enzimas extracelulares, a otras moléculas de menor peso molecular o a la interacción de estos factores.

El presente proyecto propone utilizar pulpa del café como sustrato para la producción de lombricomposta, ya que es una materia orgánica ampliamente disponible en la zona centro de Veracruz. Así mismo, plantea la adición de polvo de caparazones de jaiba (PCJ), como nutriente suplementario en el proceso de lombricompostaje, para promover la proliferación de microorganismos consumidores de quitina que potencialmente inhiban el desarrollo de *H. vastatrix*, primordialmente en sus primeras etapas de desarrollo.

También se caracterizará el extracto cuya actividad fungicida se compruebe a través de la experimentación en laboratorio y en invernadero. Dicha caracterización se centrará en: i) la cuantificación de los nutrientes minerales en el extracto (macro y micronutrientes); ii) la cuantificación de la actividad de la enzima quitinasa y, iii) la presencia o ausencia de promotores de defensa metabólica: ácido absísico, ácido jasmónico y ácido salicílico.



**Figura 0.1.** Árbol de problemas de *H. vastatrix*. En color verde se señalan los problemas raíz, estos son aquellos a partir de los cuales se genera el problema central. Generalmente son diversos y difíciles de abordar. En color naranja se muestra el problema central, aquél en el que convergen las problemáticas raíz y funciona como cuello de botella para dar paso a los impactos o problemas consecuencia (color rojo). Las consecuencias tienden a ser la situación que afecta directamente a los ecosistemas, a la sociedad, a la economía o a los tres ámbitos. Así, el empobrecimiento de nutrientes en suelos, la acidez extrema en los mismos y las malas prácticas de cultivo en cafetales son problemas que promueven la infección por *H. vastatrix* que da paso al daño foliar en plantas de café (Avelino *et al.*, 2006). Posteriormente, el daño foliar conlleva a la menor productividad de frutos, el uso de productos químicos (aumentando costos de producción) y al cambio de prácticas de cultivo (Perfecto *et al.*, 2005), todo lo cual converge en la pérdida de servicios ecosistémicos de los cafetales de sombra (Manson *et al.*, 2008).

### 1.1.1 El cultivo de café

El café es uno de los productos más comercializados en México cuyo valor económico ascendió a \$48,000,000 US en 2012 (FAO, 2015), convirtiéndolo en una de las principales actividades primarias para Veracruz. En particular, el cultivo de este producto bajo sombra, además de contribuir con una cantidad importante de ingresos a la nación y al estado de Veracruz, funciona como reservorio de biodiversidad al proteger una gran cantidad de especies arbóreas, epífitas, animales, entre otras (Moguel y Toledo, 1999; Perfecto *et al.*, 2005) contribuyendo a la conservación de la megadiversidad que tiene México (SEMARNAT, 2007). Otro beneficio de esta actividad es que facilita el mantenimiento de otros servicios ambientales como: captura de agua, suministro de recursos maderables/no-maderables, bonos de carbono, entre otros (Manson *et al.*, 2008).

A pesar de la gran importancia del cultivo de café de sombra, actualmente los cafetales enfrentan una significativa disminución de su productividad, debido a las infecciones causadas por el hongo *Hemileia vastatrix*, también llamada roya naranja del café (Avelino *et al.*, 2006; Manson *et al.*, 2008). Junto con otros factores, la baja productividad de las plantas ha hecho que los productores cambien sus prácticas de cultivo (Perfecto *et al.*, 2005) o bien, usen fungicidas cúpricos sintéticos (como el caldo bordelés usado desde 1917; Schieber, 1972; Avelino *et al.*, 2006; Manson *et al.*, 2008) que impactan negativamente a nivel ecológico y económico, afectando los servicios ambientales que ofrecen, la utilidad neta de los productores y elevando los costos de producción (Manson *et al.*, 2008). El aumento de costos por pérdida de cosecha y esfuerzos de mitigación se ha estimado entre el 6 y 13% del valor de la producción mundial de café lo cual, monetariamente, se traduce en alrededor de mil millones de dólares (Hein y Gatzweiler, 2006).

Paralelamente al cultivo del café, uno de los desechos orgánicos más abundantes generados en su procesamiento es la pulpa del fruto de café; la cual se produce en grandes cantidades y, generalmente, es apilada, generando lixiviados y mal olor. Desde 1990 en la zona centro de Veracruz esta materia orgánica es utilizada como sustrato para realizar lombricompostaje (Capistrán *et al.*, 2001) y así, es convertida en un subproducto que coadyuva en el mantenimiento sustentable y sostenible del agroecosistema. Recientemente, se han estado produciendo extractos de composta, de lombricomposta o lixiviados de sustratos orgánicos que son aplicados a cultivos, pero son producidos de forma empírica sin metodologías estandarizadas impidiendo conocer la razón por la cual estos son o no efectivos (Chukwujindu *et al.*, 2006).

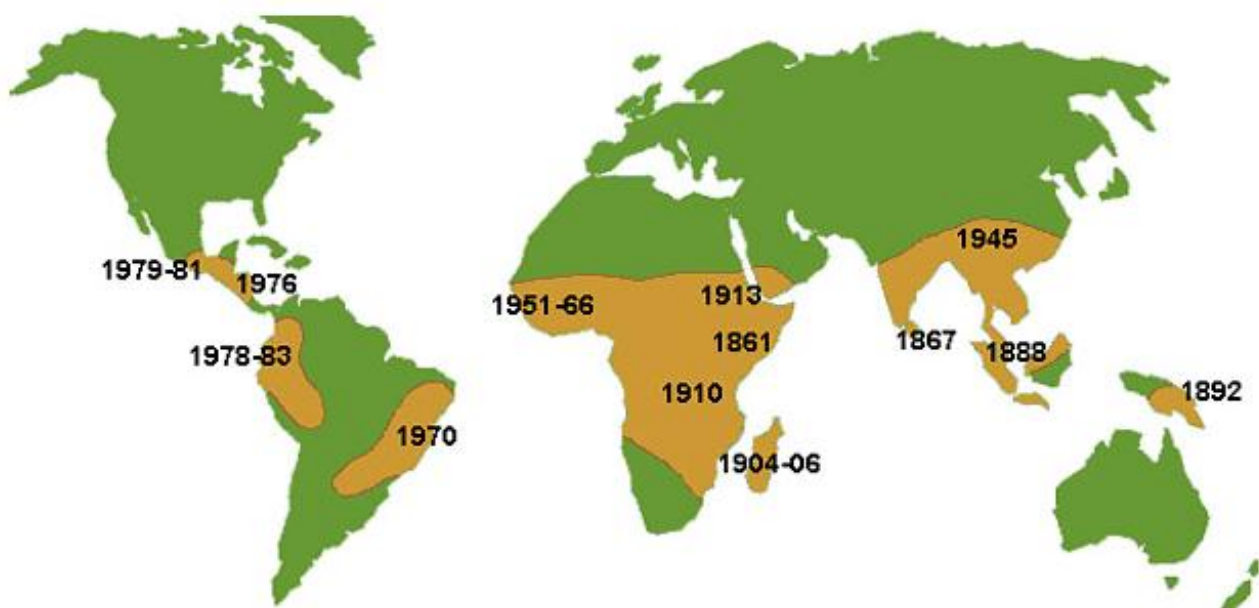
### **1.1.1.1 *Hemileia vastatrix*, agente causal de la roya del café**

Debido a que *Coffea arabica* es originalmente de Etiopía se cree que la roya tuvo su origen en las montañas de Uganda, África en los años 1860's (Schieber, 1972). La roya fue posteriormente reportada en Sri Lanka en el año 1869, extendiéndose posteriormente a la India en 1870, Sumatra en 1876, Java en 1878, Filipinas en 1889, Kenya y Congo en 1913, Costa de Marfil en 1954, Liberia en 1955, Nigeria en 1962, Angola en 1966 (Schieber, 1972), Puerto Rico en 1968 (sin embargo, fue erradicada), Brasil en 1970 y México entre 1979 y 1982 (Schieber y Zentmyer, 1984; figura 0.2).

Actualmente, la roya del café es una de las principales enfermedades del café (Manson *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2012) a nivel mundial. En 2015, la severidad de la infección por roya en el estado de Veracruz fue tal que los productores no tuvieron cosechas lo cual motivó al Gobierno Federal a invertir 15, 000,000 de pesos en el estado de Guerrero para combatir y controlar la plaga (SAGARPA, 2015). Las infecciones de la roya en las hojas causan el decremento de la fotosíntesis e incrementa la defoliación prematura en las plantas de café (Jackson *et al.*, 2012). La roya usualmente no mata a la planta, pero le debilita progresivamente, resultando en una severa muerte de sus partes periféricas del árbol (die-back y Schieber, 1972) y con ello la disminución de su productividad.

La roya del café actualmente es controlada, por lo general, a través de la aplicación de fungicidas cúpricos (Schieber, 1972; Dordas, 2008). A pesar de su efectividad, el método de control químico conlleva importantes consecuencias negativas, como son: el aumento de los costos de producción, daño a otras especies fúngicas y vegetales, promover el desarrollo de poblaciones de hongos resistentes y riesgo a la salud humana (Boulter *et al.*, 2002; Dordas, 2008).

Métodos secundarios de control de roya son el uso de variedades de café resistentes y métodos de cultivo eficientes (Avelino *et al.*, 2006) como la reducción de cobertura de sombra (Jackson *et al.*, 2012). A pesar de estos esfuerzos, esta enfermedad continúa siendo un importante problema en el estado de Veracruz, por lo que es necesario centrar esfuerzos en encontrar alternativas que permitan eliminar o disminuir la incidencia del hongo *H. vastatrix* en las principales zonas cafetaleras del centro de Veracruz, en donde las fincas con cafetales bajo sombra ocupan la mayor área dedicada a este cultivo (Manson *et al.*, 2008).



**Figura 0.2.** Dispersión global de la roya del café a través de la historia<sup>1</sup>

### 1.1.1.2 Ciclo de vida de *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome

*Hemileia vastatrix* es el agente causal de la roya del café, se trata de un hongo Pucciniomycete que pertenece al orden de los Puccinales, ubicado en el phylum Basidiomycota. De acuerdo a la Norma Internacional para Medidas (NIM) no. 5, Glosario de términos fitosanitarios, cumple con la definición de plaga cuarentenaria al representar un peligro actual, estar bajo control oficial en el país y causar pérdidas económicas en cultivos hospedantes (SAGARPA, 2016). El único cultivo hospedante conocido es el café, por lo que se considera que esta especie es autoica (Avelino y Rivas, 2013).

Los Puccinales se encuentran entre los hongos de ciclos de vida más complejos, dado que producen diferentes tipos de esporas y, en muchos casos, requieren de un hospedero alterno para completar su ciclo de vida (Avelino y Rivas, 2013). No obstante, a pesar de su posición taxonómica, el ciclo de vida del hongo *Hemileia vastatrix* es sencillo, pues no requiere un hospedero alterno y desarrolla un solo tipo de esporas, las uredosporas, que son producidas abundantemente en el envés de la hoja formando soros o pústulas de color amarillo-naranja. En raras ocasiones, se han detectado esporas de resistencia (teliosporas), aunque su ocurrencia es muy baja (Rayner, 1972).

<sup>1</sup> Disponible en <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRustspan.aspx>

Avelino y Rivas (2013) indican que las teliosporas y basidiosporas de *H. vastatrix* son genética y morfológicamente inestables sugiriendo que no tienen una función en el ciclo y no son más que un vestigio de una forma ancestral. Las teliosporas son pediceladas, más o menos esféricas y lisas (Coutinho *et al.*, 1995), miden 15 a 18  $\mu\text{m}$  de longitud (son más pequeñas que las urediosporas que miden 30  $\mu\text{m}$  de largo y 20  $\mu\text{m}$  de ancho (SAGARPA, 2016).

Las basidiosporas, por su parte, son en su mayoría de forma globular-lisa, aunque también pueden tornarse reniformes (Rayner, 1972). Las urediosporas, a diferencia de las basidiosporas y telidiosporas tienen dos texturas, lisas por la cara interna y rugosas en la externa (SAGARPA, 2016). Esta rugosidad, presente en una sola cara de la urediospora, se debe a la presencia de pequeñas protuberancias en forma cónica (espinas) que miden entre 1-1.5  $\mu\text{m}$  y son la razón que condujo al nombre del género, hemi=medio, y leios=liso (Rayner, 1972).

El ciclo de vida de la roya del café se puede sintetizar en cuatro importantes etapas (figura 0.3).



**Figura 0.3.** Soros o pústulas de *H. vastatrix*, confieren la característica distintiva de la enfermedad. Localidad: El Palmar, Veracruz, México.





**Figura 0.4.** Ciclo de vida de *H. vastatrix*. La fotografía de clorosis corresponde a los experimentos controlados en invernadero. La liberación del inóculo (esporas listas para desprenderse) fue fotografiada en la localidad de El Palmar, Veracruz, México. Fotos electrónicas (fases de deposición e infección) tomadas con el apoyo de Tiburcio Laponte en microscopio electrónico de barrido.

Partiendo del estado de urediospora el hongo puede transportarse a través del aire o las gotas del agua para poder llevar a cabo su deposición en la hoja de otras plantas de café. Con las condiciones ambientales apropiadas, la espora lleva a cabo la infección al germinar y extender un tubo germinativo que crece hasta entrar a la planta a través de los estomas. Dentro de la hoja el hongo desarrolla su micelio y posteriormente se manifiesta la sintomatología de la infección denominada clorosis. Esta etapa se caracteriza por mostrar lesiones o manchas amarillas que posteriormente se vuelven coalescentes. Estas lesiones pasan a la etapa de liberación del inóculo, la cual consiste en la formación de pústulas de color anaranjado, compuestas de miles de urediósporas que son liberadas al ambiente y dispersadas por el viento, la lluvia, insectos, humanos y otros.

### 1.1.2 Extracto acuoso de lombricomposta (ExLom)

El ExLom es el producto de un proceso de suspensión de lombricomposta de diversos sustratos en agua (Arancon *et al.*, 2007). Es una solución rica en nutrientes y microorganismos (Raoudha *et al.*, 2009) con potencial para brindar minerales requeridos por cultivos vegetales (Arancon *et al.*, 2007) y disminuir los daños causados por hongos patógenos (El-Masry *et al.*, 2002).

A pesar de los buenos resultados del extracto de lombricomposta como fertilizante líquido (Brinton *et al.*, 1996; Arancon *et al.*, 2007) y como solución anti-fúngica (Gurama *et al.*, 2012; Kavroulakis *et al.*, 2010), se necesita evidencia científica concluyente sobre los parámetros que intervienen en su efectividad, como el sustrato de lombricompostaje, proporción ideal de lombricomposta con agua, aireación, tiempo de suspensión y filtración (Scheuerell y Mahaffee, 2006; Chukwujindu *et al.*, 2006; Dordas, 2008).

En este marco se ha propuesto que, para alcanzar objetivos específicos deben usarse métodos específicos de producción. Es decir, investigar de forma detallada factores clave, como: a) el tipo de materia prima para la producción de composta como son: estiércol, residuos de jardín, desechos frutales; Naidu *et al.*, 2013); b) relación composta:agua generalmente se usa 1:3 o 1:5 vol/vol (Zaller, 2006; Dianéz *et al.*, 2006; Naidu *et al.*, 2013); c) tiempo de incubación de la mezcla composta:agua (24 a 72 h; Arancon *et al.*, 2007); d) aireación o uso de bombas de aire para agitar la mezcla durante su incubación (St. Martin *et al.*, 2012) y e) la adición de nutrientes suplementarios como melazas, hidrolizado de pez, extractos de levadura o algas (Naidu *et al.*, 2010).

Derivado de las experiencias de los diversos métodos de producción probados a la fecha, se ha reportado que el extracto de composta es: **1)** fertilizante foliar, al contener componentes activos como ácidos fúlvicos solubles en agua, humatos particulares y materiales que promueven la disponibilidad de los nutrientes (Lazcano y Domínguez, 2011; Gómez-Brandón *et al.*, 2015); **2)** supresor de enfermedades en hojas de plantas hongos causadas por los patógenos pertenecientes a los géneros *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Plectosporium* y *Verticillium* (Cronin *et al.*, 1996; Scheuerell y Mahaffee, 2006; Arancon *et al.*, 2007) debido a la riqueza microbiana y a la abundancia de enzimas quitinasas y  $\beta$  1,3 glucanasas (El-Masry *et al.*, 2002); y, **3)** provee de promotores de defensa metabólica contra hongos, tales como: ácido absícico, ácido jasmónico y ácido salicílico (Ping y Boland, 2004).

#### 1.1.2.1 Actividad antifúngica del extracto acuoso

La actividad antifúngica de una sustancia es la disminución del desarrollo o crecimiento de hongos al ser aplicada. En este caso particular, el desarrollo de la roya visualizado a través de la disminución o inhibición de la germinación de sus esporas y el daño foliar.

Para combatir las enfermedades foliares ocasionadas por hongos, tradicionalmente se usan productos sintéticos. Sin embargo, estos tratamientos no siempre son totalmente efectivos (Raoudha *et al.*, 2009), además, las consecuencias del intenso uso de sustancias químicas biosidas incrementan la contaminación ambiental, peligros de salud y, en ocasiones, tienen efectos fitotóxicos (Polavarapu, 2000). Derivado de esta problemática, Cronin, (1996) El-Masry *et al.*, (2002), Dianéz *et al.* (2006), entre otros autores, han manifestado que los extractos de composta o lombricomposta pueden representar, una alternativa atractiva para el control de enfermedades foliares (Cronin, 1996) en oposición a los tratamientos convencionales (Dianéz *et al.*, 2006).

Dianéz *et al.* (2006) expone que la mayoría de estas pruebas se centran en el control de hongos patógenos en la parte aérea de las plantas sin embargo también se ha mostrado efectividad en la rizósfera pero que, a pesar de la evidencia científica disponible y la larga evidencia empírica, es necesario profundizar el conocimiento de los mecanismos biológicos a través de los cuales actúan los extractos con el objeto de potencializar su eficiencia en la supresión de enfermedades tanto en las partes aéreas como en la rizósfera de las plantas (Dianéz, 2006).

De forma general, la actividad antifúngica de los extractos ha sido atribuida a los microorganismos existentes al punto de ser considerados como un factor crucial en su eficacia de supresión de enfermedades (El-Masry *et al.*, 2002; Naidu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012). Estas importantes poblaciones microbiológicas tienden a aumentar el número de organismos durante los procesos de extracción y son diferentes en función de los sustratos utilizados (Fritz *et al.*, 2012).

#### **1.1.2.1.1 Microorganismos en el extracto**

Ya que el factor microbiológico ha sido considerado clave del éxito del ExLom en la supresión de patógenos foliares (El-Masry *et al.* 2002; Scheuerell y Mahaffee 2002; Dianéz *et al.* 2006 y Zmora-Nahum *et al.* 2008), se ha hipotetizado que esto puede deberse a la exitosa depredación o parasitismo de los patógenos por parte de bacterias y hongos líticos que se encuentran en él (Hadar y Papadopolou, 2012) dando lugar a un control biológico de enfermedades.

En este contexto, se han aislado microorganismos pertenecientes a los géneros *Chaetonium*, *Geomyces*, *Penicilium* y *Trichoderma*, mismos que están relacionados a efectos antifúngicos por lo que se cree que podrían ser responsables de la eficacia en el control biológico de enfermedades a través del uso de ExLom (Danon *et al.*, 2010; Jayakumar y Natarajan, 2013).

#### **1.1.2.1.2 Las quitinasas y su efecto en el control de hongos fitopatógenos**

Otra de las fracciones de los extractos a las que se les ha atribuido un potencial efecto supresor de hongos patógenos son las enzimas quitinasas. Estas son enzimas como la quitobiosa que degradan

quitina, hidrolizan aleatoriamente enlaces glicosídicos de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) para producir oligosacáridos (Musumeci y Paoletti, 2009). La quitina es, después de la celulosa, el biopolímero más abundante en la naturaleza y es producida por nematodos, moluscos, artrópodos, crustáceos, insectos, hongos, algas y levaduras como protección física y componente estructural (Musumeci y Paoletti, 2009).

La gran abundancia de la quitina y su impacto potencial en el ambiente ha llevado al desarrollo enzimas quitinasas que hidrolizan la quitina para que los organismos (sea parásito, depredador o saprobio) puedan usarla como fuente de energía al degradarla hasta sus monómeros N-acetil-glucosamina o bien para protegerse contra patógenos que estén constituidos por quitina (Musumeci y Paoletti, 2009). Este último punto es de particular interés para el presente estudio puesto que los hongos, contienen quitina en sus estructuras somáticas la cual, además de brindarles protección, funge como componente estructural. Por lo tanto, es natural suponer que la abundancia de quitinasa en el ambiente lo haría inhóspito para el desarrollo de hongos al digerir la capa quitinosa del hongo y exponer el contenido de sus hifas al ambiente.

Lo anterior lleva al razonamiento de que el agregar quitina como nutriente suplementario en el proceso de lombricompostaje podría aumentar la proliferación de microorganismos consumidores de quitina y con ello la actividad específica de la enzima quitinasa. Al mismo tiempo, al realizar un extracto acuoso de una lombricomposta rica en quitinasa se debería obtener un ExLom rico en quitinasas el cual habría de ser más efectivo en el control biológico de la roya.

### **1.1.2.2 Nutrientes minerales en ExLom**

De acuerdo con Díaz *et al.*, (2007) el método más simple de estimar la calidad agronómica del ExLom (como un tipo de abono o fertilizante) y así tener noción de su valor económico es a través del cálculo de la materia orgánica y nutrientes minerales disponibles para las plantas, particularmente el contenido de los macronutrientes nitrógeno y fósforo. La composta contiene dos formas de nitrógeno, orgánico (aproximadamente 85%) e inorgánico (10-15%) en donde sólo el inorgánico está disponible inmediatamente para las plantas.

En particular, la importancia de la riqueza de nutrientes en el extracto de lombricomposta para su uso como fertilizante ha sido destacada por Zaller (2006) y Arancon *et al.*, (2007) en donde ambos grupos de investigación obtuvieron resultados positivos al usar el extracto en el cultivo orgánico de tomate y pepino.

Por lo anterior, la caracterización de la riqueza de nutrientes en el extracto de lombricomposta es una etapa importante para evaluar su calidad.

### **1.1.2.3 Promotores de defensa metabólica**

Los promotores de defensa metabólica son factores de crecimiento vegetal que activan mecanismos fisiológicos que disminuyen el desarrollo de los patógenos en ellas, fenómeno conocido como Resistencia Sistémica Inducida o RSI (Hadar y Papadopoulou, 2012). Estos compuestos se diferencian de las hormonas de crecimiento, las cuales son compuestos orgánicos que se sintetizan en alguna parte de la planta y se traslocan a otra parte del mismo organismo en donde, en concentraciones muy bajas, causan una respuesta fisiológica: promotora o inhibitoria (Salisbury, 1985 y Audesirk, 2017). Por el contrario, los factores de crecimiento, aunque pueden ser compuestos químicos idénticos a las hormonas, no son producidos por las plantas, son producidos por organismos externos (Salisbury, 1985).

Ante esta panorámica, en el presente estudio se buscó detectar y cuantificar factores de crecimiento como: ácido jasmónico, ácido absísico y ácido salicílico que promuevan la activación de RSI y con ello otorguen, potencialmente, protección a la planta de café ante la roya.

En el caso de detectar estos promotores de defensa metabólica, el ExLom podría promover la defensa metabólica de las plantas aún al ser esterilizado (siempre y cuando el método de esterilización no desnaturalice los promotores de defensa). De esta manera se evitaría la dispersión de microorganismos indeseables en el ambiente ya que existen ciertas preocupaciones sobre la sanidad del uso de extractos con organismos vivos (Brinton *et al.*, 1996) pues dichos microorganismos podrían ser potencialmente patógenos para el ser humano (Arancon *et al.*, 2007). El efecto sería causado por compuestos como ácido absísico, ácido salicílico o ácido jasmónico (Ping and Boland, 2004; Puga-Freitas *et al.*, 2012), no por organismos vivos.

### **1.1.2.4 Los compuestos fenólicos y el control de enfermedades fúngicas**

Los compuestos fenólicos son otro grupo de sustancias de interés en el estudio del ExLom. Ya que dichos compuestos fenólicos, como el ácido 4-hidroxibenzoico, la vanilina y el ácido trans-cinámico, tienen efectos antifúngicos (Kosová *et al.*, 2015; Bezerra *et al.*, 2017 y Hazir *et al.*, 2017) y son producidos por microorganismos del suelo (Hazir *et al.*, 2017) es posible que los compuestos fenólicos que se encuentran en la lombricomposta y en el ExLom pudiendo ser aprovechados como agentes antifúngicos contra la roya del café.

## **1.2. Justificación**

Ante la creciente problemática que presenta el cultivo de café bajo sombra por la propagación de la roya del café, se requieren métodos innovadores que coadyuven en la disminución de esta enfermedad y, a la vez, eviten los impactos negativos de los productos químicos utilizados en la actualidad. Los extractos obtenidos de lombricompostas pueden contener uno o varios elementos

supresores de enfermedades fúngicas foliares como son: enzimas quitinasa-betaglucanasa (El-Masry *et al*, 2002), microbios antagónicos como actinomicetes, bacterias y levaduras (Elad y Shtienberg, 1994; El-Masry *et al.*, 2002) y factores de crecimiento que promuevan la defensa metabólica de las plantas.

Por ello resulta relevante profundizar en investigaciones sobre los extractos para: fundamentar la estandarización de su método de producción, conocer su composición química (nutrientes minerales), los elementos de origen biológico (enzimas quitinasa y fitohormonas) y evaluar su efectividad ante la roya del café a través de bioensayos.

### 1.3. Preguntas de investigación

- ✓ ¿Cuáles son las características físico y químicas del ExLom de pulpa de café?
- ✓ ¿El ExLom de pulpa de café disminuye la germinación e infección de *H. vastatrix* en *Coffea arabica*, coadyuvando en la mitigación de daño foliar?
- ✓ ¿Qué fracción (microbiológica o no microbiológica) del extracto otorga el efecto anti fúngico sobre *H. vastatrix*?
- ✓ ¿La esterilización del ExLom de pulpa de café disminuye su efecto como agente de control biológico de *H. vastatrix*?
- ✓ ¿La adición de quitina en el proceso de lombricompostaje induce la síntesis de quitinasas?

### 1.4. Hipótesis de investigación

Si el extracto de lombricomposta contiene componentes (microorganismos, promotores de defensa metabólica, compuestos fenólicos y enzimas quitinasa) que inhiben el desarrollo de los patógenos fúngicos foliares, entonces es posible que algunos de dichos componentes disminuyan la germinación de esporas de *H. vastatrix* y, en consecuencia, el daño foliar en *Coffea arabica* ocasionado por este fitopatógeno.

### 1.5. Objetivos de investigación

Objetivo general

Evaluar el ExLom de pulpa de café como potencial inhibidor de la roya del cafeto *H. vastatrix*.

Objetivos específicos

- ✓ Estandarizar la obtención de extracto de lombricomposta de pulpa de café para el control efectivo de la roya del café.

- ✓ Caracterizar física y químicamente el extracto acuoso de lombricomposta de pulpa de café incluyendo los factores de crecimiento: ácido absícico, ácido jasmónico y ácido salicílico.
- ✓ Evaluar el efecto inhibitorio del extracto de lombricomposta en la germinación de *H. vastatrix*.
- ✓ Determinar si los microorganismos presentes en el extracto de lombricomposta tienen un efecto supresor en la germinación de roya.
- ✓ Determinar si existe una correlación entre la actividad de la enzima quitinasa del extracto de lombricomposta y el porcentaje de germinación de esporas y el daño foliar provocado por *H. vastatrix* en plantas de café.

Con el objeto de proponer cada capítulo como un potencial artículo publicable en revistas indizadas, cada uno fue redactado con el formato IMRAD y cuentan con su propia lista de referencias. Así mismo la numeración de figuras y cuadros se reinicia con cada capítulo.

## Referencias

- Arancon NQ, Edwards CE, Dick R, Dick L (2007) Vermicompost tea production and plant growth impacts. *Biocycle*. November:2.
- Audesirk T (2017) Biology. Life on earth with physiology. 9ª edición. Pearson Education.
- Avelino J, Zelaya H, Merlo A, Pineda A, Ordoñez M, Savery S (2006) The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. *Ecological Modelling*. 197(3-4):431-447.
- Avelino J, Rivas G (2013) La roya anaranjada del cafeto. <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>, 47.
- Bezerra CF, Camilo CJ, Silva MKN, de Freitas TS, Ribeiro-Filho J, Coutinho HDM (2017) Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria. *Microbial pathogenesis*. 113:265-268.
- Boulter JJ, Boland GJ, Trevors JT (2002) Assessment of compost for suppression of Fusarium patch (*Microdochium nivale*) and Typhula Blight (*Typhula ishikariensis*) snow molds of turfgrass. *Biological control*. 25(2):162-172.
- Brinton WF, Tränkner A, Droffner M (1996) Investigations into liquid compost extracts. *Biocycle*. 37(11):69-70.
- Capistrán F, Aranda E, Romero JC (2001) Manual de reciclaje, compostaje y lombricompostaje. 1ª edición. Editorial Instituto de Ecología, A. C. Mexico.
- Chukwujindu MAI, Egun AC, Emuh FN, Isirimah NO (2006) Compost maturity evaluation and its significance to agriculture. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9(15):2933-2944.
- Coutinho TA, Rijkenberg FHJ, Van AMAJ (1995) Teliospores of *Hemileia vastatrix*. *Mycological research*. 99(8):932 – 934.
- Cronin MJ, Yohalem DS, Harris RF, Andrews JH (1996) Putative mechanism and dynamics of inhibition of the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* by compost extracts. *Soil biology and biochemistry*. 28(9):1241-1249.
- Danon M, Chen Y, Hadar Y (2010) Ascomycete communities associated with suppression of *Sclerotium rolfsii* in compost. *Fungal ecology* 3(1):20-30
- Dianéz F, Santos M, Boix A, de Cara M, Trillas I, Avilés M, Tello JC (2006) Grape marc compost tea suppressiveness to plant pathogenic fungi: Role of siderophores. *Compost science and utilization*. 14(1):48-53.



- Díaz LF, Bertoldi M, Bidlingmaier W, Stentiford D (2007) Compost science and technology. 1ª edición. Editorial Elsevier. Estados Unidos de América.
- Dordas C (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development*. 28(1):33-46.
- El-Masry MH, Khalil AI, Hassouna MS, Ibrahim HAH (2002) *In situ* and *in vitro* suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World journal of microbiology and biotechnology*. 18(6):551-558.
- Elad Y, Shtienberg D (1994) Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Crop protection*. 13(2):109-114.
- Food and Agriculture Organization (2015) Agricultural Production Statistics. FAO, Roma. Recuperado de <http://faostat3.fao.org/search/coffee/>
- Fritz JI, Franke-Whittle IH, Haindl S, Insam H, Braun R (2012) Microbiological community analysis of vermicompost tea and its influence on the growth of vegetables and cereals. *Canadian journal of microbiology*. 58(7):836-847.
- Gomez-Brandon M, Vela M, Martínez-Toledo MV, Insam H, Domínguez J (2015) Effects of compost and vermicompost teas as organic fertilisers. Capítulo en: Sinha S, Pant KK, Bajpai S. *Advances in Fertiliser Technology: Synthesis* (Vol. 1). Editorial Studium Press.
- Gurama AU, Haruna SG, Adebitan SA (2012) Characteristics and anti fungal effect of composts on *Fusarium oxysporum* F. SP. *lycopersici* incitant of *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of biodiversity and environmental sciences*. 2(7):23-31.
- Hadar Y, Papadopoulou KK (2012) Suppressive Composts: Microbial ecology links between abiotic environments and healthy plants. *Annual Review of Phytopathology*. 50(1):133-153.
- Hazir S, Shapiro-Ilan DI, Bock CH, Leite LG (2017) Trans-cinnamic acid and *Xenorhabdus szentirmaii* metabolites synergize the potency of some comercial fungicides. *Journal of Invertebrate Pathology*. 145:1-8.
- Hein L, Gatzweiler F (2006) The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. *Ecological Economics*. 60(1):176-185.
- Jackson D, Skillman J, Vandermeer J (2012) Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*. 61(1):89-97.
- Jayakumar P, Natarajan S (2013) Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. *Applied soil ecology* 70:33-47

- Kavroulakis N, Ntougias S, Besi MI, Katsou P, Damaskinou A, Ehaliotis C, Zervakis GI, Papadopoulou KK (2010) Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant soil*. 333(1-2):233-247.
- Kosová M, Hrádková I, Mátlová V, Kadlec D, Smidrkal J, Filip V (2015) Antimicrobial effect of 4-hydroxybenzoic acid ester with glycerol. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 40(4):436-440.
- Lazcano C, Sampedro L, Zas R, Domínguez J (2010) Vermicompost enhances germination of the maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *New Forests*. 39(3):387-400.
- Manson RH, Hernández-Ortíz V, Gallina S, Mehltreter K (eds) (2008) Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz. Biodiversidad, manejo y conservación. 1ª edición. Editorial Instituto de Ecología A. C. e Instituto Nacional de Ecología. México.
- Moguel P, Toledo VM (1999) Review: Biodiversity conservation in traditional coffee systems of Mexico. *Conservation Biology*. 13(1):11 – 21.
- Musumeci S, Paoletti MG (2009) Binomium Chitin-Chitinase. Recent issues. Editorial Nova Biomedical. Estados Unidos de América.
- Naidu Y, Meon S, Kadir J, Siddiqui Y (2010) Microbial starter for the enhancement of biological activity of compost tea. *International journal of agricultural and biology*. 12(1):51 - 56.
- Naidu Y, Meon S, Siddiqui Y (2013) Foliar application of microbial-enriched compost tea enhances growth, yield and quality of muskmelon (*Cucumis melo* L.) cultivated under fertigation system. *Scientia Horticulturae*. 159:33-40.
- Perfecto I, Vandermeer J, Mas A, Soto PL (2005) Biodiversity, yield, and shade coffee certification. *Ecological economics*. 54(4):435 – 446.
- Ping L, Boland W (2004) Signals from the underground: bacterial volátiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*. 9(6):263 – 266.
- Polavarapu S (2000) Evaluation of phytotoxicity of Diazinon and Captan formulations on highbush blueberries. *Horttechnology* 10(2):308-314.
- Puga-Freitas R, Barot S, Taconnat L, Renou JP, Blouin M (2012) Signal molecules mediate the impact of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on growth, Development and defence of the plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 7(12):10.
- Raoudha KBJ, Rabiaa H, Mohamed AT, Jean-Jaques G, Khaled H, Mohamed BK, Belgacem H (2009) Composts, composts extracts and bacterial suppressive action on *Pythium*

*aphanidermatum* in tomato. *Pakistan Journal of Botany*. 41(1):315 – 327.

Rayner RW (1972) Micología, historia y biología de la roya del cafeto. IICA-CATIE. Publicación miscelánea, Costa Rica.

SAGARPA (2015) Fortalecen acciones para el combate y control de la roya del café en Guerrero. Comunicado de prensa. No. 435/15.

SAGARPA (2016) Roya del cafeto. *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome. Ficha técnica no. 40. Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. México.

Salisbury FB (2000) Fisiología de las plantas. Editorial Thomson Learning. España.

Scheuerell SJ, Mahaffee WF (2006) Variability associated with suppression of gray mold (*Botrytis cinerea*) on geranium by foliar applications of non aerated and aerated compost teas. *Plant disease*. 90(9):1201-1208.

Scheuerell S, Mahaffee W (2002) Compost tea: Principles and prospects for plant disease control. *Compost science and utilization*. 10(4):313-338.

Schieber E (1972) Economic impact of coffee rust in Latin America. *Annual Review of Phytopathology*. 10(1):491 – 510.

Schieber E, Zentmyer GA (1984) Coffee rust in the Western hemisphere. *Plant disease*. 68(2):89 – 93.

SEMARNAT (2007) ¿Y el medio ambiente? Problemas en México y el mundo. SEMARNAT. México.

St. Martin C, Dorinvil W, Brathwaite R, Ramsubhag A (2012) Effects and relationship of compost type, aeration and brewing time on compost tea properties, efficacy against *Pythium ultimum*, phytotoxicity and potential as a nutrient amendment for seedling production. *Biological Agriculture and Horticulture*. 28(3):23.

Tamamaura T, Sawa T, Isshiki K, Masuda T, Homma Y, Inuma H, Naganawa H, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H (1985) Isolation and characterization of terpentecin a new antitumor antibiotic. *The journal of antibiotics*. 38(12):1664 – 1669.

Xu D, Raza W, Yu G, Zhao Q, Shen Q, Huang Q (2012) Phytotoxicity analysis of extracts from compost and their ability to inhibit soil-borne pathogenic fungi and reduce root-knot nematodes. *World journal of microbiology and biotechnology*. 28(3):1193-1201.

- Zaller J (2006) Foliar spraying of vermicompost extracts: Effects on fruit quality and indications of lateblight suppression of field-grown tomatoes. *Biological agriculture and horticulture*. 24(2):165-180.
- Zmora-Nahum S, Danon M, Hadar Y, Chen Y (2008) Chemical properties of compost extracts inhibitory to germination of *Sclerotium rolfsii*. *Soil Biology and Biochemistry*. 40:2523-2529.

## **2. Capítulo 1: Production and uses of high quality compost and vermicompost watery extracts**

**Authors:** Hernández-Hernández Eduardo, Barois Isabelle, Alarcón-Gutiérrez Enrique, Guerrero-Analco José Antonio, Avelino Jacques and Hernández Christian Arturo.

**2.1. Abstract:** Compost or vermicompost watery extracts, also called compost teas, are water based solutions that contain a wide range of chemical and biochemical compounds, as well as microbial organisms. It has been argued that the results derived from the applications of these extracts are not easy to replicate. Part of this problem is due to the difficulty to find well described compost-extract production methods. In this article we review the information available on compost extracts and register the factors commonly considered in those reports. This article provides general trends for producing compost or vermicompost extracts with various applications and suggests a definition of high quality compost extract. Through this review we also show the gaps in scientific reports that hinder their replication.

**Key words:** Compost tea, organic agriculture, plant disease suppression.

### **2.2. Introduction**

Compost watery extracts, commonly known as compost extracts or teas, have drawn the world's attention because of their benefits which are mostly in the field of organic agriculture as liquid fertilizers or diseases suppressing solutions (El-Masry *et al.*, 2002, Naidu *et al.*, 2010). Since the 1990's more and more scientific studies around the globe are trying to understand their properties mechanisms of action (Brinton *et al.*, 1996, El-Masry *et al.*, 2002, Dianéz *et al.*, 2006). These studies are focused on the interest to find cheap, non-hazardous, environmental-friendly liquid fertilizers and plant disease panaceas; something that has not yet been achieved.

Compost extracts are conceptualized as liquid extracts obtained by mixing compost and water for a defined period (Ingham, 2002). In this sense, any compost, mixed with any water is considered a compost extract, which in turn gives the possibility of obtaining a wide number of compost extract types with an enormous amount of results. Thus, if researchers are not clear enough about their procedure, the replication of their work is difficult. In other words, there is a lack of detailed and experimental scientific research in the field (Chukwujindu *et al.*, 2006), or they do not represent all the information needed to replicate their results. This scarcity of information in compost extracts' production methods causes confusion (Scheuerell and Mahaffee, 2006; Chukwujindu *et al.*, 2006; Dordas, 2008; Hadar and Papadopoulou, 2012) about which method should be used to obtain a certain type of compost extract and where that extract can successfully be applied.

Thus, this review aims to present the most commonly employed compost-extract's production

methods, their outcomes, characteristics and their given uses. Our article indicates general trends for producing compost extracts with several applications, suggests a definition of high quality compost extract and aims to boost its use while avoiding further misuses. Through this review we also inform on the gaps in scientific reports that make their replication difficult.

## **2.3. Production methods**

### **2.3.1. Compost feedstock**

The election of the type of organic matter, or compost feedstock, is fundamental for determining the compost characteristics and the compost extracts. As proved by Capistrán *et al.*, (2001) the mineral content, microbial richness and diversity, vary depending on the feedstock used for composting. Since compost extract is derived from solid compost, which is derived from the organic matter degradation, the characteristics presented by the solid compost are naturally the ones that their watery extract will inherit. In this sense, the first step to foresee the compost extract's quality is to observe the characteristics of the original compost.

Regarding compost feedstock election, there are two major factors: 1) availability, and 2) if they represent a potential environmental danger. In this sense, solid municipal wastes which usually provides high nutrient compost extracts, agricultural wastes, manure (from pigs or cows) and residues from the food industry (Table 1.1) are compliant with both factors since they are constantly produced in large amounts and, when not decomposed, they have negative impacts on environmental or human health. Therefore, feedstock election is not a problem since municipal solid wastes, food industry and cattle are widely distributed throughout the world.

### **2.3.2. Composting conditions**

Most authors (Carballo *et al.*, 2009; Randin y Warman, 2010; Hirzel *et al.*, 2012; Fritz *et al.*, 2012) do not explain the aerobic composting method since it is quite simple. They commonly refer to it as a mixture of moistened organic feedstocks flipped every three or seven days to accelerate their degradation and stabilization. By and large, authors who write about compost extracts only mention the used substrates, e.g. plant residues from the food industry (Hirzel *et al.*, 2012) but fail to describe the C:N ratio, type of food or industry or the breakdown stage of organic matter when composting initiated, reached compost pile temperature, and so on (Table 1.1 and Table 1.2). This data is important to replicate methodologies, and their omission difficults the replication of compost-production methods and compost extracts'. Some cases even fail to mention the type of decomposed organic matter, without which information it is impossible to replicate a compost experiment.

**Table 1.1.** Macro and micronutrients of different compost or vermicompost watery extracts (g L<sup>-1</sup>).

Compost extract	Organic matter	pH	EC, mS cm <sup>-1</sup>	N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			Macro and micronutrients (mg L <sup>-1</sup> )							Source
				N- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	P		K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	
Non-aerated vermicompost extract	Not reported	8.21	7,030	1.53	34		12	1,385	360	289	0.65	0.27	0.22	0.23 Marin <i>et al.</i> , 2013
Compost extract	Agricultural waste	7.5	0.6-	-	-			290	20.7	4.5	6.7	13.6	0.1	0.1 Mengesha <i>et al.</i> , 2017
Vermicompost extract	Donkey manure, plants	7.8	10.3-	-	-			9,700	48.2	4.7	27.2	13.4	6.4	5.3 Mengesha <i>et al.</i> , 2017
Compost extract	Solid municipal waste	7.8	8.6-	-	-			7,850	71.9	5.9	18.8	11.9	4.9	2.3 Mengesha <i>et al.</i> , 2017
Direct extraction compost	Pig manure and rice straw	7.53	4.32-	-			183	897-	-	-	-	-	-	Xu <i>et al.</i> , 2012
Aerated compost extract	Pig manure and rice straw	7.52	5.91-	-			202.7	962-	-	-	-	-	-	Xu <i>et al.</i> , 2012
Non-aerated compost extract	Pig manure and rice straw	8.13	5.76-	-			222.4	1,012-	-	-	-	-	-	Xu <i>et al.</i> , 2012
Vitafert Compost extract	Plant residues from the food industry	6.96	3.38	0.51	199	0.27	64	437.4	39.5	0.05	-	0.09	0.03	Hirzel <i>et al.</i> , 2012
Vermicast, vermicompost extract	Green plant parts, cattle manure, and agricultural plant waste	8.52	1.52	3.96	90	14.2	108	-	94	-	-	-	-	Fritz <i>et al.</i> , 2012
Municipal Solid Waste Compost extract	Municipal solid waste (largely kitchen and yard waste)	7.8	-	-	-	0.625	109	85.5	19.8	0.43	0.09	0.01	0.06	Randin y Warman, 2010
Municipal Solid Waste Compost extract	Bovine manure and straw bedding	9.7	4.16	13.3	-	-	-	-	-	-	-	81	832	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Municipal Solid Waste Compost extract	Municipal solid waste 7 weeks of composting plus 1-2 months of maturation	8.9	2.13	14.2	-	-	-	-	-	-	-	141	457	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Municipal Solid Waste Compost extract	Municipal solid waste 7 weeks of composting	6.72	2.82	130.7	-	-	-	-	-	-	-	208	490	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Aerated Municipal Solid Waste Compost extract	Municipal solid waste from Nova Scotia, Canadá	7.68	-	0.8	117	1.8	334	88.9	27.4	0.8	0.15	0.09	0.1	Hargreaves <i>et al.</i> , 2009
Compost extract	Not reported	6.56	923	-	-	7.3	201	88	115	66	-	-	7.33	Said Ahl <i>et al.</i> , 2010

When composting conditions are reported, they commonly describe piles of organic matter which are turned from time to time. From the 26 included compost extract reports in table 1.2, almost 50% did not report composting conditions, making results replication impossible.

To fill this information gap, composting stages and relevant production factors are widely described in the contribution of Díaz *et al.*, (2007), which may serve as a guide for compost-related scientific research. These authors explain microbiologic characteristics of the composting process, guidelines about substrates, environmental factors affecting the compost and stability of the process. In addition, the compost feedstocks characterization by advanced technology (e.g. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance and Fourier Transform InfraRed) could bear light on the effect of the parental chemical structure on the compost's final characteristics.

## **2.4. Compost extract production method**

### **2.4.1. Compost water ratio**

Once the solid compost is well characterized, in order to obtain a watery-compost-extract, the next step is to determine the compost:water combination ratio. The use of a minimum quantity of compost in a maximum volume of water is needed to obtain maximum benefits. This compost:water mixture allows the nutrients, microorganisms, enzymes, growth promoting molecules, and others, to solubilize or suspend into a watery matrix which is easier to transport through commonly used irrigation systems (Arancon *et al.*, 2007). When successfully carried out, extract compost benefits can be applied with less effort over bigger surfaces.

Bioassays have successfully tested compost extract's proportion in a very large range from 1:1 (compost:water vol:vol) to 1:200 (Arancon *et al.*, 2007). The reason for these experiments is not only to obtain compost's maximum efficiency but also to prevent its possible phytotoxicity (this will be reviewed later). Even when most authors use a 1:4 to 1:7 weight:volume ratio, the 1:20 ratio has also shown to be effective as an organic fertilizer and a disease suppressive solution (Table 1.2). In this sense, we consider the ideal ratio should be calculated through short experiments that offer the best results on desired variables with no adverse effects (as phytotoxicity; Table 1.3).



**Table 1.2.** Different methods to obtain compost or vermicompost extract according to several authors and their outcomes.

Substrate	Feedstock	Composting conditions	Incubation time	Ratio	Use	Cite
Vermi-compost	Food waste	Not reported	Not reported	1:1 (v/v)	Organic fertilizer on cucumbers and tomatoes	Arancon <i>et al.</i> , 2007
Vermi-compost	Food waste	Not reported	Not reported	1:4 (v/v)	Organic fertilizer on cucumbers and tomatoes	Arancon <i>et al.</i> , 2007
Vermi-compost	Food waste	Not reported	Not reported	1:20 (v/v)	Organic fertilizer on cucumbers and tomatoes	Arancon <i>et al.</i> , 2007
Vermi-compost	Fruit, vegetable and cotton waste	Windrow composting system with <i>Eisenia foetida</i>	1 day	1:2 (v/v)	Organic fertilizer on organic certified <i>Lycopersicon esculentum</i>	Zaller, 2006
Vermi-compost	Fruit, vegetable and cotton waste	Windrow composting system with <i>Eisenia foetida</i>	1 day	1:2 (v/v)	Unsuccessful as disease suppressor	Zaller, 2006
Compost	Crop plants	Moist 50-60%/ turn each week / ratio carbon/nitrogen 30:1	10 min	1: 2 (w/v)	Disease suppression when not autoclaved	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Grape marc	Not reported	1 day	1:3 (w/v)	Disease suppression except when sterilized	Dianéz <i>et al.</i> , 2006
Compost	Grape marc	Not reported	1 week	1:3 (w/v)	Disease suppression except when sterilized	Dianéz <i>et al.</i> , 2006
Compost	Grape marc	Not reported	2 weeks	1:3 (w/v)	Disease suppression except when sterilized	Dianéz <i>et al.</i> , 2006
Compost	Fresh spent mushroom substrate	40 kg lost were stored in plastic garbage containers for there months	7 days	1:4 (w/v)	Desease suppression except when filtering	Cronin <i>et al.</i> , 1996
Compost	Out-door stored spent mushroom substrate	40 kg lost were stored in plastic garbage containers for there months	7 days	1:4 (w/v)	Disease suppression against <i>Venturia inaequalis</i> except when filtering	Cronin <i>et al.</i> , 1996
Compost	Banana leaf, saw dust, cow manure, gypsum, 11 Nitro-Plus 9TM and lawn clipping compost	Daily turned rotary barrel composters by Minnich and Hunt for two weeks	18 hours	1:20 (w/v)	Disease suppression against <i>Phythium ultimum</i> even when autoclaved.	St. Martin <i>et al.</i> , 2012
Compost	Banana leaf, saw dust, cow manure, gypsum, 11 Nitro-Plus 9TM and lawn clipping compost	Daily turned rotary barrel composters by Minnich and Hunt for two weeks	27 hours	1:20 (w/v)	Disease suppression against <i>Phythium ultimum</i> even when autoclaved	St. Martin <i>et al.</i> , 2012
Compost	Banana leaf, saw dust, cow manure, gypsum, 11 Nitro-Plus 9TM and lawn clipping compost	Daily turned rotary barrel composters by Minnich and Hunt for two weeks	36 hours	1:20 (w/v)	Disease suppression against <i>Phythium ultimum</i> even when autoclaved	St. Martin <i>et al.</i> , 2012

Compost	Banana leaf, saw dust, cow manure, Daily turned rotary barrel composters by gypsum, 11 Nitro-Plus 9TM and lawn clipping compost	Minnich and Hunt for two weeks	2.3 days	1:20 (w/v)	Disease suppressor but no fertilization effect was observed	St. Martin <i>et al.</i> , 2012
Compost	Banana leaf, saw dust, cow manure, Daily turned rotary barrel composters by gypsum, 11 Nitro-Plus 9TM and lawn clipping compost	Minnich and Hunt for two weeks	4.6 days	1:20 (w/v)	Disease suppressor but no fertilization effect was observed	St. Martin <i>et al.</i> , 2012
Compost	Banana leaf, saw dust, cow manure, Daily turned rotary barrel composters by gypsum, 11 Nitro-Plus 9TM and lawn clipping compost	Minnich and Hunt for two weeks	7 days	1:20 (w/v)	There was pathogen inhibition and liquid fertilizer	St. Martin <i>et al.</i> , 2012
Compost	Fruit bunch and palm oil mill waste	Not reported	3 days	1:5 (w/v)	Disease suppression and liquid fertilizer	Naidu <i>et al.</i> , 2013
Compost	Solid olive mill wastes, <i>Posidonia oceanica</i> and chicken manure	Not reported	6 days	1:5 (v/v)	Disease suppression	Raoudha <i>et al.</i> , 2009
Compost	Poultry manure	Organic matter flipped every week or twice a week on pits of 1.2 x 0.9 x 1.2 m, watered and covered with a polyethylene sack for four weeks. Then kept on another pit for three months until uniform decomposition.	7 days	1:5 (w/v)	Disease suppression	Gurama <i>et al.</i> , 2012
Compost	Cow dung		7 days	1:5 (w/v)	Disease suppression	Gurama <i>et al.</i> , 2012
Compost	Neem-leaf		7 days	1:5 (w/v)	Disease suppression	Gurama <i>et al.</i> , 2012
Compost	17.5% tomato, 20.5% escarole residues, 60% woodchips and 2% mature compost	45 day periodic aeration static piles followed buy a two-month curing period.	14 days	1:5 (v/v)	Disease suppression	Pane <i>et al.</i> , 2012
Compost	25% tomato, 13% escarole residues, 60% woodchips and 2% mature compost	45 day periodic aeration static piles followed buy a two-month curing period.	14 days	1:5 (v/v)	Disease suppression	Pane <i>et al.</i> , 2012
Compost	37% tomato, 11% escarole residues, 50% woodchips and 2% mature compost	45 day periodic aeration static piles followed buy a two-month curing period.	14 days	1:5 (v/v)	Disease suppression	Pane <i>et al.</i> , 2012
Compost	50% tomato, 48% woodchips and 2% mature compost	45 day periodic aeration static piles followed buy a two-month curing period.	14 days	1:5 (v/v)	Disease suppression	Pane <i>et al.</i> , 2012

#### **2.4.2. Incubation time**

Most authors consider important the incubation time of the compost:water mixture. According to Elad and Shtienberg (1994) the incubation time may give or take the possibility of suppressing disease in a compost extract even when using the same feedstock, composting method and compost:water ratio (Gurama *et al.*, 2012). Through ideal incubation time, the compost extract producer can collect his extract faster, saving time and obtaining maximum benefits in his plots.

Unfortunately, there is no general agreement for the ideal incubation time. Trials have been made with 10 minutes and several weeks incubated compost:water mixtures (Table 1.2); all of them aiming to produce liquid fertilizers and/or plant-disease suppressive compost extracts and most of them succeeded. In this scenario, we would suggest to establish experiments to evaluate the shortest time required to offer the best expected results and to look for relationships with initial compost properties (e.g. pH, electrical conductivity, humic and fulvic content, etc.).

#### **2.4.3. Aeration: Why, how & when**

According to Ingham (2002), Arancon *et al.*, (2007) and Carballo *et al.*, (2009) aeration is fundamental in order to obtain a non-phytotoxic microbial rich extract. Aerobic microbes are more suitable to suppress plant diseases and represent less danger to human health than microbes incubated in non-aerated compost extracts (Ingham, 2002; Scheuerell and Mahaffee, 2004).

In opposition to Ingham (2002) other sources imply that non-aerated compost extracts offer equal, if not better results than aerated extracts when used as organic fertilizers or plant-disease suppressors (Marin *et al.*, 2013 and Xu *et al.*, 2012). Recently, scientific papers have established no significant differences between aeration and non-aeration in compost mixture incubation (Table 1.2). Non-aerated compost extracts may be preferred to aerated ones since non-aerated compost extracts need no specialized technology or energy to pump in air or stir the mixtures making them cheaper and easier to produce (Ingham, 2002). In this context, we would suggest the first-efforts-bioassays be carried out with non-aerated extracts.

#### **2.4.4. Nutritional supplements**

The use of nutritional supplements in compost mixture incubation aims to promote a specific microbial community development or certain molecules and biomolecules production (Scheuerell and Mahaffee, 2004; Arancon *et al.*, 2007). As previously stated, part of the interest in compost extracts is due to their microbial richness, enzymes and effect of nutrient application. With this idea, the objective of nutritional supplements is to promote the growth of fungi or bacteria which can produce beneficial enzymes or will parasite/depredate plant pathogens (Scheuerell and Mahaffee, 2004).

However, the use of nutritional supplements may not just promote the development of “beneficial” microbes but also of human pathogens (Arancon *et al.*, 2007). In this sense, the use of supplemental nutrients has been rejected by Arancon *et al.*, (2007) to prevent possible health dangers. Thus, more research is needed to avoid this negative approach.

As a consequence, in this debate, it should be noted that there is no single compost extract production method. Many methods offer positive results although the same methods might offer negative results when something such as the compost feedstock is changed. Here we present what we consider are the most important decisions to make: when choosing feedstock and caring for composting conditions, compost:water ratio, etc. But, to reduce costs, the ideal method should be guided by your particular interests and your own, regional, bioassays.

## **2.5. Quality**

### **2.5.1. Mineral nutrients**

The mineral content in compost, and their derived compost extracts, offer nutrients to plants (Boulter-Bitzer *et al.*, 2006). Most compost extracts, independently of their feedstock, contain plant-macronutrients (i.e. nitrogen, phosphorus and potassium) and some micronutrients (Table 1.1). A commonly used parameter to measure salts and nutrient availability is electrical conductivity which is also commonly measured when a compost extract is produced (Xu *et al.*, 2012; Marin *et al.*, 2013; Mengesha *et al.*, 2017).

Even so, caution should be exercised because compost extract production derived from feedstocks could present a higher nutrient content than the recommended dosis. For example, Xu *et al.*, (2012) showed that the compost extracts obtained from pig manure and rice straw compost may have four times more nitrogen than recommended by the NOM-001-1996 (Oficial Mexican Law that regulates the quality of river water in agriculture, 1997) which may be harmful for the plants and crops (Xu *et al.*, 2012).

On the other hand, depending on the compost feedstock, heavy metals may also be present (Randin and Warman, 2010; Carballo *et al.* 2009; Hargreaves *et al.*, 2009; Marin *et al.* 2013). They found that compost extracts derived from composts of municipal-solid-wastes, spent mushroom substrate, grape marc and horticultural crop residues have high concentrations of chrome, nickel, lead, and cadmium (regarding NOM-001-1996, 1997; EPA, 2016; and European water quality regulation, 2013).

Nevertheless, these authors only searched for heavy metals because they worked with municipal solid waste and industrial residues as compost feedstocks which represents a health risk with a high concentration of these elements. The amounts of heavy metals are not shown in table 1.1 because

heavy metals analyses are not normally part of compost extract nutrient analysis. Authors generally do not search for these compounds. In this context, other well characterized and widely recommended compost extracts may also present high heavy metal concentrations.

### **2.5.2. Identified plant-growth promoting molecules (PGPM)**

Several authors (Cronin *et al.*, 1996, El-Masry *et al.*, 2002 and Xu *et al.*, 2012) suggested that the results obtained in crops from compost extract applications were not due (partially) to mineral richness but to the presence of plant-growth promoting molecules (PGPM). These molecules, such as jasmonic acid, sugars, amino acids, humic acids, indole acetic acid (Canellas *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2012; Jayakumar and Natarajan, 2013) are known to promote plant growth, flowering or fruiting (Xu *et al.*, 2012).

PGPM are supposed to be present in compost extracts because of their microbial populations which can produce molecules identical to plant hormones and to modify plant environments (Jayakumar and Natarajan, 2013). It is important to mention that, to the best of our knowledge, no study so far has isolated and quantified these molecules from compost watery extracts. In this circumstance, the previously stated idea remains as a theory.

PGPM have been studied by isolating and growing bacterias and fungi from solid compost (Jayakumar and Natarajan, 2013). Puga-Freitas *et al.*, (2012) carried out *in vivo* tests comparing plant growth when using phytohormones (indol-acetic acid) and compost watery extract applications finding similar developments. This has led to believe that if PGPM come from compost microorganisms and compost extracts that show similar behavior, then these microorganisms may pass from solid compost to compost extract. Also, humic acids and other substances have important effects on plant growth or promoting metabolic defense (Puga-Freitas and Blouin, 2014).

## **2.6. Applications**

### **2.6.1. Organic agriculture**

The main use of compost extract is related to enhance plants' health, growth and also crop yield enhancement (Brinton *et al.*, 1996, Arancon *et al.*, 2007). As previously stated, compost extracts have a wide variety of mineral nutrients, many of which are available for plants uptake. This led to the study and quantification of the nutrients to prove compost-extract's usefulness for organic crops.

This usefulness of compost extracts as a liquid fertilizer is a generally accepted idea since, regardless their original compost, extracts have macro and micronutrients such as nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, and others (Table 1.1). This mineral nutrient content has given the idea that compost extracts may successfully serve as a liquid fertilizer for a wide range of organic crops (Zaller, 2006; Arancon *et al.*, 2007). Tests have shown that tomatoes,

muskmelons and cucumbers that have been cultivated with compost watery extracts have good fruit quality (Table 1.2).

Due to the presence of PGPM compost extracts have also been expected to promote germination (Arancon *et al.*, 2007). In this scenario, the germination of maritime pine was increased by more than 16% when using a compost extract (Lazcano, 2010). Unfortunately compost extracts have also presented a phytotoxic effect (Carballo *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012).

### **2.6.2. Anti-foliar disease use**

Since 1990's (Cronin *et al.*, 1996) there has been a great interest in using compost extracts to suppress fungi-foliar diseases (Kyung and Deok, 2011) and this has been successful (Table 1.2). This interest is derived from the fact that fungicides are associated to production costs, having non target effects, to promote the development of fungicide-resistant populations and human health risks (Boulter *et al.*, 2002; Dordas, 2008).

Although compost extract's disease suppression mechanisms are not completely understood (Dordas, 2008; Gomez-Brandon *et al.*, 2015) they have been mostly attributed to microorganism activity, such as parasitism, niche-competition or depredation at a microcosms level (Dianéz *et al.*, 2006; Dianéz *et al.*, 2007; Kavroulakis *et al.*, 2010; Gurama *et al.*, 2012; Gomez-Brandon *et al.*, 2015). For example, the mycoparasites *Chaetomium*, *Geomyces*, *Penicillium* and *Trichoderma* were isolated from compost extracts and are supposed to be related to anti fungal effects (Danon *et al.*, 2010) among other bacterial strains (Jayakumar and Natarajan, 2013). With much less attention, disease suppression has also been attributed to enzymes such as chitinase from plants or from microorganisms (Schlumbaum *et al.*, 1986).

It is important to mention that this microbial activity may be derived from compost, since composting and vermicomposting stimulate and accelerate microbial activity and organic matter decomposition (Domínguez *et al.*, 2010). Actually, Hadar and Papadopoulou (2012) reviewed this disease suppressive effect on solid compost and they assured that the plant disease suppression is the direct result of the activity of a consortia of antagonistic microorganisms. This fact enlightens the importance of the need for a well described composting process in scientific literature.

In this context, compost extracts from diverse feedstocks, have been used to treat diseases caused by fungi like *Pythium debaryanum* that causes damping-off, *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* the pathogen of Panama sickness (Gurama *et al.*, 2012), *Sclerotium bataticola* which causes damping-off (El-Masry *et al.*, 2002), *Phytophthora infestans* a fungi-like protist that causes late blight (Zaller, 2006) or *Rhizoctonia solani* cause of sheath blight disease (Kavroulakis *et al.*, 2010).

In other cases, extract has also been successfully used to treat leaf spots and blights caused by

*Alternaria alternata* (Pane *et al.*, 2012), bunch rot derived from *Botrytis cinerea*'s infection (Pane *et al.*, 2012), corky root disease in tomato caused by *Pyrenochaeta lycopersici* (Pane *et al.*, 2012). It has also been used against *Verticillium dahliae* the wilt fung, *Pythium aphanidermatum* cause of damping-off disease (Raoudha *et al.*, 2009), *Phytophthora parasitica* that causes rot and damping-off (Dianéz *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2014) and others (Scheuerell and Mahaffee, 2002; Mee *et al.*, 2010; Segarra *et al.*, 2009; Gomez-Brandon *et al.*, 2015; Table 1.2).

Disease suppression is one of the most commonly reported effects of compost and vermicompost extracts since positive results have suggested the great potential of these extracts to treat more than a dozen sicknesses caused by fungi to more than one hundred plant species including several of commercial interest.

## **2.7. Adverse effects**

### **2.7.1. Phytotoxicity**

This is an important subject to consider since compost extracts are commonly phytotoxic (Carballo *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012). Most compost extract related studies ignore the fact that their compost extract application may have a negative impact on the plant.

In more than 44 studied compost extracts in scientific literature reviewed at least 23 had no tests in their work to measure some adverse effect (Table 1.3). The only negative side effect considered is phytotoxicity, which is described as an intoxication of living plants by substances present in the growth medium (Carballo *et al.*, 2009), commonly measured through a germination index (abbreviated as GI in table 1.3).

According to Carballo *et al.*, (2009), phytotoxicity is not related to heavy metals presence. Moreover, phytotoxicity is correlated with the compost's pH and ammonium concentration; lower pH and higher ammonium concentration means higher phytotoxicity. This phytotoxic effect is diminished, as proved by Xu *et al.*, (2012), by diluting the compost extract, the higher dilution the lower phytotoxicity.

**Table 1.3.** Relation between compost extract's dilution factor and phytotoxic effect.

Substrate	Feedstock	Extract's dilution	Adverse effect	Cite
Compost	Banana leaf	100%	"Compost teas were not phytotoxic"	St. Martin <i>et al.</i> , 2012
Compost	Lawn clipping	100%	"Compost teas were not phytotoxic"	St. Martin <i>et al.</i> , 2012
Compost	Fruit bunch and palm oil mill waste	100%	Not tested	Naidu <i>et al.</i> , 2013
Compost	Solid olive mill wastes, <i>Posidonia oceanica</i> and chicken manure	100%	Not tested	Raoudha <i>et al.</i> , 2009
Vermicompost	Fruit, vegetable and cotton waste	100%	Not tested	Zaller, 2006
Compost	Cow or chicken manure, residues from timber production ( <i>Eucalyptus sp.</i> , <i>Pinus radiata</i> ) and from commercial culture of Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )	100%	Not tested	Evans <i>et al.</i> , 2013
Compost	Spent mushroom substrate	100%	"No phytotoxicity symptoms were observed" (nor GI or essay plant are reported)	Marin <i>et al.</i> , 2013
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	100%	Phytotoxic (30% GI - Cress)	Xu <i>et al.</i> , 2012
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	100%	Phytotoxic (25% GI - Lettuce)	Xu <i>et al.</i> , 2012
Compost	Municipal solid waste	100%	Phytotoxic (0% GI - Lettuce)	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Compost	Bovine manure and bedding straw	100%	Phytotoxic (0% GI - Lettuce)	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Compost	Bovine manure and bedding straw	75%	Phytotoxic (10% GI - Lettuce)	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Compost	Municipal solid waste	75%	Phytotoxic (7% GI - Lettuce)	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Compost	Bovine manure and bedding straw	50%	Phytotoxic (30% GI - Lettuce)	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Compost	Municipal solid waste	50%	Phytotoxic (25% GI - Lettuce)	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	50%	Phytotoxic (75% GI - Lettuce)	Xu <i>et al.</i> , 2012
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	50%	Phytotoxic (40% GI - Cress)	Xu <i>et al.</i> , 2012
Compost	Spent mushroom substrate	31.64%	Not tested	Cronin <i>et al.</i> , 1996
Compost	Bovine manure and bedding straw	25%	Phytotoxic (60% GI - Lettuce)	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Compost	Municipal solid waste	25%	Phytotoxic (50% GI - Lettuce)	Carballo <i>et al.</i> , 2009
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	25%	Phytotoxic (90% GI - Lettuce)	Xu <i>et al.</i> , 2012
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	25%	Phytotoxic (45% GI - Cress)	Xu <i>et al.</i> , 2012



Vermicompost	Not reported	20%	“No practical problems were found”	Arancon <i>et al.</i> , 2007
Compost	Leafy fruit orchards	15%	Not tested	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Crop plants	15%	Not tested	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Garden fallen leaves	15%	Not tested	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Grape marc	15%	Not tested	Dianéz <i>et al.</i> , 2006
Vermicompost	Not reported	10%	“No practical problems were found”	Arancon <i>et al.</i> , 2007
Compost	Leafy fruit orchards	10%	Not tested	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Garden fallen leaves	10%	Not tested	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Crop plants	10%	Not tested	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Grape marc	10%	Not tested	Dianéz <i>et al.</i> , 2006
Compost	Spent mushroom substrate	10%	Not tested	Cronin <i>et al.</i> , 1996
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	10%	Phytotoxic (90% GI - Lettuce)	Xu <i>et al.</i> , 2012
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	10%	Phytotoxic (65% GI - Cress)	Xu <i>et al.</i> , 2012
Vermicompost	Not reported	5%	“No practical problems were found”	Arancon <i>et al.</i> , 2007
Compost	Leafy fruit orchards	5%	Not tested	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Garden fallen leaves	5%	Not tested	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Crop plants	5%	Not tested	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
Compost	Grape marc	5%	Not tested	Dianéz <i>et al.</i> , 2006
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	5%	Non-phytotoxic (100% GI - Lettuce)	Xu <i>et al.</i> , 2012
Compost	Pig manure and rice straw (3:1)	5%	Phytotoxic (85% GI - Cress)	Xu <i>et al.</i> , 2012
Compost	Spent mushroom substrate	3.16%	Not tested	Cronin <i>et al.</i> , 1996
Compost	Spent mushroom substrate	1%	Not tested	Cronin <i>et al.</i> , 1996

## 2.8. Conclusions

Compost extracts are produced through many different extraction methods that do not always show the same results preventing their use in larger applications. Even when there is a need for a wider scientific explanation regarding compost feedstocks characteristics, composting conditions, bioreactors, compost:water ratio, incubation time, compost dilutions, studied uses and phytotoxicity, when it comes to the best extraction method to use, we suggest to run first-efforts-bioassays with non-aerated extracts because of their positive outcomes and cheap- easy making process. Also, according to the evidences it is imposible to discriminate the higher or lower quality of compost versus vermicompost extracts since vermicompost extracts present a highly variable mineral content with almost the same positive results as compost extracts. In this sense both are viable alternatives to produce compost and an effective compost extract.

A high quality compost extract should be a nutrient (N-NO<sub>3</sub>>100; P>10; K>1000; Ca> 100; Mg>100; Fe>5; Mn>1; Cu>5; Zn>5; ppm of mineral concentration) and PGPM- (indo-acetic-acid, humic acids, jasmonic acid) rich compost extract with low (lower than stipulated by NOM-001-1996, EPA, 2016 or European water quality regulation, 2013) and with no heavy metals presence. In other words, a high quality compost extract is one with a large quantity of nutrients that can be diluted and used in a great number of crops (avoiding nutrient waste or phytotoxicity); whose microbial richness will enable the use of the compost extract as a disease suppression liquid and/or to promote plant growth and finally, the absence of heavy metals will allow it to be used without endangering wild life or human health.

## 2.9. Acknowledgements

We would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Mexico for their economic support; Instituto de Ecología, A. C. for their institutional back up and digital tools provided and to all our colleagues that helped in this work by giving their ideas, information and critical opinions.

## 2.10. References

- Arancon NQ, Edwards CE, Dick R, Dick L (2007) Vermicompost tea production and plant growth impacts. *Biocycle* November:2
- Boulter JI, Boland GJ, Trevors JT (2002) Assessment of compost for suppression of Fusarium patch (*Microdochium nivale*) and Typhula Blight (*Typhula ishikariensis*) snow molds of turfgrass.

- Boulter-Bitzer JJ, Trevors JT, Boland GJ (2006) A polyphasic approach for assessing maturity and stability in compost intended for suppression of plant pathogens. *Applied soil ecology* 34:65-81
- Brinton WF, Tränkner A, Droffner M (1996) Investigations into liquid compost extracts. *Biocycle* 37(11):69-70
- Canellas LP, Lopes OF, Okorokova-Façanha AL, Rocha AF (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant physiology* 130:1951-1957
- Capistrán F, Aranda E, Romero JC (2001) Manual de reciclaje, compostaje y lombricompostaje. 1<sup>a</sup> edición. Editorial Instituto de Ecología, A. C. Mexico
- Carballo T, Gil MV, Calvo LF, Morán A (2009) The influence of aeration system, temperature and compost origin on the phytotoxicity of compost tea. *Compost science and utilization* 17(2):127-139
- Chukwujindu MAI, Egun AC, Emuh FN, Isirimah NO (2006) Compost maturity evaluation and its significance to agriculture. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(15):2933-2944
- Cronin MJ, Yohalem DS, Harris RF, Andrews JH (1996) Putative mechanism and dynamics of inhibition of the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* by compost extracts. *Soil biology and biochemistry* 28(9):1241-1249
- Danon M, Chen Y, Hadar Y (2010) Ascomycete communities associated with suppression of *Sclerotium rolfsii* in compost. *Fungal ecology* 3(1):20-30
- Dianéz F, Santos M, Boix A, de Cara M, Trillas I, Avilés M, Tello JC (2006) Grape marc compost tea suppressiveness to plant pathogenic fungi: Role of siderophores. *Compost science and utilization* 14(1):48-53
- Dianéz F, Santos M, Tello JC (2007) Suppressive effects of grape marc compost on phytopathogenic oomycetes. *Archives of phytopathology and plant protection* 40(1):1-18
- Díaz LF, Bertoldi M, Bidlingmaier W, Stentiford D (2007) Compost science and technology. 1<sup>a</sup> edición. Editorial Elsevier. Estados Unidos de América.
- Domínguez J, Aira M, Gómez-Brandón M (2010) Vermicomposting: Earthworms enhance the work of

- microbes. 27p. Book chapter in: H. Insam et al., Microbes at work. Springer.
- Dordas C (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development* 28(1):33-46
- El-Masry MH, Khalil AI, Hassouna MS, Ibrahim HAH (2002) *In situ* and *in vitro* suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World journal of microbiology and biotechnology* 18(6):551-558
- Elad Y, Shtienberg D (1994) Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Crop protection* 13(2):109-114
- EPA (2016) National recommended water quality criteria for aquatic life. Available on: <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>
- European water quality regulation (2013) Directive 2013/39/EU of the European parliament and of the Council of 12 August 2013. Available on: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32013L0039&from=ES>
- Evans KJ, Palmer AK, Metcalf DA (2013) Effect of aerated compost tea on grapevine powdery mildew, botrytis bunch rot and microbial abundance on leaves. *European Journal of Plant Pathology* 135(4):661-673
- Fritz JI, Franke-Whittle IH, Haindl S, Insam H, Braun R (2012) Microbiological community analysis of vermicompost tea and its influence on the growth of vegetables and cereals. *Canadian journal of microbiology* 58(7):836-847
- Gomez-Brandon M, Vela M, Martínez-Toledo MV, Insam H, Domínguez J (2015) Effects of compost and vermicompost teas as organic fertilisers. Capítulo en: Sinha S, Pant KK, Bajpai S. *Advances in Fertiliser Technology: Synthesis* (Vol. 1). Editorial Studium Press.
- Gurama AU, Haruna SG, Adebitan SA (2012) Characteristics and anti fungal effect of composts on *Fusarium oxysporum* F. SP. *lycopersici* incitant of *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of biodiversity and environmental sciences* 2(7):23-31
- Hadar Y, Papadopoulou KK (2012) Suppressive Composts: Microbial ecology links between abiotic environments and healthy plants. *Annual Review of Phytopathology* 50(1):133-153

- Hargreaves JC, Adl MS, Warman PR (2009) The effects of municipal solid waste compost and compost tea on mineral element uptake and fruit quality of strawberries. *Compost science and utilization* 17(2):85-94
- Hirzel J, Cerda F, Millas P, France A (2012) Compost tea effects on production and extraction of nitrogen in ryegrass cultivated on soil amended with commercial compost. *Compost science and utilization* 20(2):97-104
- Ingham ER (2002) The compost tea brewing manual. Soil Foodweb Inc. USA.
- Jayakumar P, Natarajan S (2013) Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. *Applied soil ecology* 70:33-47
- Kavroulakis N, Ntougias S, Besi MI, Katsou P, Damaskinou A, Ehaliotis C, Zervakis GI, Papadopoulou KK (2010) Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant soil* 333(1-2):233-247
- Kyung MS, Deok KK (2011) Biocontrol activity and primed systemic resistance by compost water extracts against anthracnoses of pepper and cucumber. *Phytopathology* 101(6):732-740
- Lazcano C, Sampedro L, Zas R, Domínguez J (2010) Vermicompost enhances germination of the maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *New Forests* 39(3):387-400
- Marin F, Santos M, Dianéz F, Carretero F, Geam FJ, Yau JA, Navarro J (2013) Characters of compost teas from different sources and their suppressive effect on fungal phytopathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(8):1371-1382
- Marin F, Dianéz F, Santos M, Carretero F, Gea FJ, Castañeda C, Navarro MJ, Yau JA (2014) Control of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica* on pepper (*Capsicum annuum* L.) with compost teas from different sources, and their effects on plant growth promotion. *Phytopathologia Mediterranea* 53(2):216-228
- Mee KS, Jeon-Gyu K, Ki DK (2010) Biocontrol activity and induction of systemic resistance in pepper by compost water extracts against *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 100(8):10
- Mengesha WK, Powdell SM, Evans KJ, Barry KM (2017) Diverse microbial communities in non aerated teas suppress bacterial wilt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*

- Naidu Y, Meon S, Kadir J, Siddiqui Y (2010) Microbial starter for the enhancement of biological activity of compost tea. *International journal of agricultural and biology* 12(1):51 - 56
- Naidu Y, Meon S, Siddiqui Y (2013) Foliar application of microbial-enriched compost tea enhances growth, yield and quality of muskmelon (*Cucumis melo* L.) cultivated under fertigation system. *Scientia Horticulturae* 159:33 - 40
- NOM-001-1996 (1997) Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales. Available on: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997)
- Pane C, Celano G, Villico D, Zaccardelli M (2012) Control of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Pyrenochaeta lycopersici* on tomato with whey compost-tea applications *Crop protection*. 38:80 - 86
- Puga-Freitas R, Barot S, Taconnat L, Renou JP, Blouin M (2012) Signal molecules mediate the impact of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on growth, Development and defence of the plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7(12):10
- Puga-Freitas R, Blouin M (2014) A review of the effects of soil organisms on plant hormone signaling pathways. *Environmental and experimental botany* 114:104-116
- Randin AM, Warman PR (2010) Assessment of productivity and plant nutrition of brussels sprouts using municipal solid waste compost and compost tea as fertility amendments. *International Journal of Vegetable Science* 16(4):374 - 391
- Raoudha KBJ, Rabiaa H, Mohamed AT, Jean-Jaques G, Khaled H, Mohamed BK, Belgacem H (2009) Compost, compost extracts and bacterial suppressive action on *Pythium aphanidermatum* in tomato. *Pakistan Journal of Botany* 41(1):315 - 327
- Said-Al HAH, Hussein MS, El-Kader AAA (2010) Effect of nitrogen fertilizer and or some foliar application on growth, herb yield, essential oil and chemical composition of dragon head. *Journal of Medicinal Food Plants* 2:12 - 28
- Scheuerell S, Mahaffee W (2002) Compost tea: Principles and prospects for plant disease control. *Compost science and utilization* 10(4):313 - 338

- Scheuerell SJ, Mahaffee WF (2004) Compost tea as a container medium drench for suppressing seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 94(11):1156 - 1163
- Scheuerell SJ, Mahaffee WF (2006) Variability associated with suppression of gray mold (*Botrytis cinerea*) on geranium by foliar applications of non aerated and aerated compost teas. *Plant disease* 90(9):1201 - 1208
- Schlumberg A, Mauch F, Vögeli U, Boller T (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324(6095):365 - 367
- Segarra G, Reis M, Casanova E, Trillas MI (2009) Control of powdery mildew (*Erysiphe polygoni*) in tomato by foliar applications of compost tea. *Journal of Plant Pathology* 91(3):683 - 689
- St. Martin C, Dorinvil W, Brathwaite R, Ramsubhag A (2012) Effects and relationship of compost type, aeration and brewing time on compost tea properties, efficacy against *Pythium ultimum*, phytotoxicity and potential as a nutrient amendment for seedling production. *Biological Agriculture and Horticulture* 28(3):23
- Xu D, Raza W, Yu G, Zhao Q, Shen Q, Huang Q (2012) Phytotoxicity analysis of extracts from compost and their ability to inhibit soil-borne pathogenic fungi and reduce root-knot nematodes. *World journal of microbiology and biotechnology* 28(3):1193 - 1201
- Zaller J (2006) Foliar spraying of vermicompost extracts: Effects on fruit quality and indications of lateblight suppression of field-grown tomatoes. *Biological agriculture and horticulture* 24(2):165 - 180





### 3. Capítulo 2. Estandarización de la obtención y caracterización de un extracto acuoso de lombricomposta a base de pulpa de café: Efecto en la germinación de esporas *Hemileia vastatrix*

**Autores:** Hernández-Hernández Eduardo, Barois Isabelle, Alarcón-Gutiérrez Enrique, Guerrero-Analco José Antonio, Avelino Jacques, Monribot Villanueva Juan Luis y Aguilar Colorado Ángel Sahid.

#### 3.1. Resumen

*Hemileia vastatrix* es causante de una de las principales enfermedades de cafetales a nivel mundial. Una alternativa que podría coadyuvar a solucionar esta problemática es el uso de extracto acuoso de lombricomposta (ExLom) cuyo efecto aún no ha sido probado en la roya del café. Así, el presente estudio tuvo por objeto estandarizar el método de obtención de un ExLom a base de pulpa de café (ExLom-P) y probarlo como inhibidor de la germinación de esporas de *H. vastatrix*. Para ello se realizaron diferentes pruebas en donde se observó la germinación de esporas de roya sumergidas en diferentes ExLom-Ps derivados de lombricompostas enriquecidas con cuatro niveles de una fuente de quitina (polvo de caparazón de jaiba; PCJ); obtenidos de tres métodos de extracción (aireado, no aireado y por decocción); así como crudos y estériles. Posteriormente, al ExLom-P que provocó la mayor inhibición de germinación de las esporas se le cuantificó la riqueza de macro nutrientes, actividad quitinasa, compuestos fenólicos y promotores de defensa metabólica (ácido jasmónico, ácido abscísico y ácido salicílico). Se observó que el ExLom-P crudo suprimió la germinación de esporas de roya (0% de esporas germinadas) y que la adición de PCJ no tuvo efecto en esta variable ni en la actividad de la enzima quitinasa ( $P > 0.05$ ). La esterilización del ExLom-P hizo que éste perdiera su capacidad para suprimir la germinación de esporas ( $98 \pm 2\%$ ). Por lo anterior se concluyó que, entre las alternativas probadas, el ExLom-P crudo, extraído por el método sin aireación, sin enriquecimiento de PCJ, es la mejor opción para disminuir la germinación de roya del café, calificándolo así como una potencial alternativa para el control biológico de este patógeno.

**Palabras clave.** Té de lombricomposta, supresión de enfermedades foliares.

#### 3.2. Introducción

##### 3.2.1. La roya del café es un problema a escala mundial

Entre las enfermedades que padecen los cultivos a nivel mundial, se destaca la roya naranja del café causada por el hongo *Hemileia vastatrix* (Avelino *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2012). Esta enfermedad disminuye la productividad de las plantas de café, y los ingresos de los cafetaleros (Avelino *et al.*,

2006). Como consecuencia, el aumento de costos por pérdida de cosecha y esfuerzos de mitigación se estima entre el 6 y 13% de la producción mundial de café, lo cual monetariamente se traduce en alrededor de mil millones de dólares anuales (Hein y Gatzweiler, 2006). Derivado de esta problemática, el uso de métodos químicos de control de enfermedades ha aumentado trayendo consigo consecuencias negativas, como son: el aumento de los costos de producción, daño a otras especies fúngicas y vegetales, promover el desarrollo de poblaciones de hongos resistentes y riesgo a la salud humana (Boulter *et al.*, 2002; Dordas, 2008). Por tanto, es necesario encontrar nuevas alternativas efectivas en el control de la roya del café y que no conlleven a los mencionados impactos negativos (Manson *et al.*, 2008).

Una alternativa que podría coadyuvar a la resolución de esta problemática es la aplicación de extracto de lombricomposta (ExLom) pues ha sido probado exitosamente para el control biológico de enfermedades fúngicas en plantas (Cronin *et al.*, 1996; Scheuerell y Mahaffee, 2002; Pane *et al.*, 2012). Desafortunadamente, por la variación y falta de especificaciones en los estudios científicos, estos resultados no son siempre replicables (Chukwujindu *et al.*, 2006) por lo que se requiere que su producción sea estandarizada a través de esfuerzos confiables y replicables.

Según Ingham (2002), los factores más importantes para la producción de extractos acuosos de composta son la elección de la materia orgánica a descomponer, los nutrientes suplementarios que se agreguen, tiempo de incubación de dicha mezcla, la aereación de la misma y la esterilización. Estos son relevantes porque su modificación puede alterar el resultado deseado (Cronin *et al.*, 1996; El-Masry *et al.*, 2002; Dianéz *et al.*, 2006 y St. Martin *et al.*, 2012). Por ende, para estandarizar la metodología, se requiere el desarrollo de experimentos específicos para cada uno de esos factores guiados por indicadores biológicos (estudios biodirigidos como se expone en Lewis *et al.*, 1999), en este caso, será la germinación de esporas de roya del café que se definió como variable de respuesta.

### 3.2.2. La materia orgánica para el proceso de lombricompostaje

Anualmente, en los beneficios de café se generan 9.4 millones de toneladas de pulpa de café a nivel mundial (Pleissner *et al.*, 2016), haciendo de este residuo agrícola la materia orgánica más disponible en las regiones cafetaleras. Por lo tanto, su aprovechamiento sería idóneo como materia prima del proceso de lombricompostaje y su consecuente producción de ExLom-P. El empleo adecuado de los productos de la pulpa de café, sometida al lombricompostaje podría ser una práctica que contribuiría no sólo al manejo de residuos sólidos (sugerido en Aranda y Barois, 2000) sino también a la mitigación del daño de la roya del café desde una perspectiva de manejo integral del agroecosistema.

### 3.2.3. Empleo de materiales con quitina como nutriente suplementario

El uso de suplementos nutricionales en la producción de extractos (biomoléculas agregadas a la mezcla de la composta o lombricomposta con agua durante la producción del ExLom) busca promover el desarrollo de una comunidad microbiana particular o la producción de ciertas moléculas y biomoléculas (Scheuerell and Mahaffee, 2004; Arancon *et al.*, 2007). Como se mencionó, parte del interés en los extractos de composta y lombricomposta se debe a su riqueza microbiana y enzimática, por lo que, en esta investigación, la inclusión de materiales que favorezcan el desarrollo de hongos o bacterias que parasiten/depreden a los agentes causales de enfermedades de plantas o simplemente produzcan enzimas que les afecten, es deseable.

Los hongos, patógenos y no patógenos, protegen sus hifas mayormente con quitina (Audesirk, 2017), por lo que una lombricomposta, y su respectivo ExLom, ricos en quitinasa (enzima degradadora de quitina) podrían dificultar el desarrollo de los hongos patógenos como la roya del café (Schlumbaum, 1986; Roberts y Selitrennikoff, 1988). Por consiguiente, de forma complementaria, con el objeto de promover el aumento de enzima quitinasa, la pulpa de café puede ser enriquecida con una fuente de quitina. La adición de quitina al proceso de lombricompostaje aumentaría naturalmente la cantidad de enzimas degradadoras de quitina, llamadas quitinasas (Poulsen *et al.*, 2008), haciendo al ambiente inhóspito para el desarrollo de la roya.

Entre las diferentes fuentes de quitina, una fuente prometedora de quitina es el caparazón de jaiba (CJ) puesto que el caparazón de los crustáceos tiene aproximadamente un 54% de quitina (Sania *et al.*, 2012). Bajo esta premisa, una estrategia para inducir el aumento de quitinasas en la lombricomposta (y su respectivo ExLom) puede ser la adición de materiales ricos en quitina como el polvo de CJ (PCJ) pues representa una alternativa semejante a la utilizada por Poulsen *et al.*, (2008) quienes añadieron exoesqueletos de camarón.

### 3.2.4. Los métodos de extracción para la producción de ExLom

Los métodos acuosos de extracción más eficaces y utilizados para producción de ExLoms son el aireado, no aireado y la decocción. Estos métodos han probado ser eficaces para la producción de ExLoms utilizados en el control de enfermedades provocadas por el género *Pythium* (Raoudha *et al.*, 2009; St. Martin *et al.*, 2012). En particular, para la roya del café, se desconoce la efectividad de cada

uno de estos métodos por lo que resulta necesario realizar una evaluación sistémica para poder realizar sugerencias en el empleo óptimo de los ExLoms para el control de la roya del café.

### 3.2.5. Efecto de la esterilización del ExLom en su efectividad como agente de control de enfermedades

La esterilización por filtración del ExLom permite vislumbrar la relevancia de su fracción microbiana en el efecto observado. Esta ha sido la pregunta principal en los trabajos de El-Masry *et al.*, (2002) y Zaller (2006) quienes encontraron resultados contradictorios. He aquí que, para entender el efecto causado por la comunidad microbiológica del ExLom, es necesario separar la fracción microbiana y evaluar la variable de respuesta. Un ExLom estéril es deseable ya que conlleva a la inhibición de los procesos fisiológicos de los microorganismos con lo que ofrece mayor estabilidad a lo largo del tiempo. Desafortunadamente, la generalidad indica que son los microorganismos los principales inhibidores del desarrollo de hongos patógenos, aunque existen algunas excepciones (St Martin *et al.*, 2012).

Por consiguiente, en este capítulo se presentan los resultados de varios experimentos que permiten estandarizar la obtención del extracto de lombricomposta de pulpa de café (ExLom-P) y caracterizar su composición química con el objetivo central de evaluar su aplicación en el control de la roya del café ocasionada por el hongo *Hemileia vastatrix*. Para ello, la investigación se dividió en cuatro etapas.

En la **primera etapa, de lombricompostaje**, se montó un experimento para determinar la cantidad apropiada de nutriente suplementario con quitina (polvo de caparazón de jaiba o PCJ), para el adecuado compostaje de la pulpa de café y la sobrevivencia de lombrices.

La segunda etapa buscó determinar el método más eficaz de extracción acuosa a partir **de la lombricomposta obtenida en la etapa 1**. De los tres métodos de extracción mayormente reportados en la literatura científica (aireado, no aireado y decocción), se eligió uno tomando como variable de respuesta el porcentaje de germinación de esporas de *H. vastatrix* al exponerlas a los diferentes extractos. Es decir, se eligió el ExLom-P en donde se detectó el menor índice de germinación de las esporas.

La tercera etapa **fraccionó el extracto seleccionado de la etapa 2** con el objetivo de evaluar la relevancia de su fracción microbiana en la disminución de la germinación de las esporas de roya. Mediante la filtración del ExLom-P con un microfiltro, se separaron los microorganismos obteniendo entonces dos extractos, uno con microbios y otro estéril. Esta etapa permitió contrastar el efecto de

ambos en la germinación de esporas, compararlos y seleccionar aquél en donde las esporas germinasen menos.

La cuarta etapa tuvo por objeto **caracterizar el extracto seleccionado** a través de los métodos descritos **en las etapas 1, 2 y 3**. Se centró en conocer los nutrientes minerales, promotores de defensa metabólica, compuestos metabólicos y actividad quitinasa a fin de explicar su efecto en las esporas de roya y discutirlo con los resultados obtenidos en otros trabajos.

### 3.3. Materiales y métodos

#### 3.3.1. Etapa 1. Proceso de lombricompostaje

##### Selección de la cantidad de nutriente suplementario

Se realizó un primer experimento con lombrices composteras con *Eisenia andrei* (llamadas comúnmente rojas californianas) para lo cual se utilizaron botes de plástico (con forma de cono trunco) con 11 cm de diámetro en la parte superior, 10 cm de diámetro en la parte inferior y 15 cm de altura en donde se agregaron 400 g de pulpa de café (10 cm de altura en el bote). Se utilizaron 250 lombrices por unidad experimental, equivalente a una densidad poblacional de 28,901 individuos por metro cuadrado que es el valor promedio que se encuentra en una cama de lombricompostaje de pulpa de café (Aranda *et al.*, 1999).

Como sustrato para la lombricomposta se utilizó pulpa de café de beneficios cafetaleros. Esta fue obtenida de un beneficio húmedo en la colonia Úrsulo Galván, a un costado de San Marcos de León (Veracruz, México), del propietario Alfonso Tepetla. La pulpa fue trasladada en tres camiones de volteo de 7 m<sup>3</sup> al Módulo Demostrativo

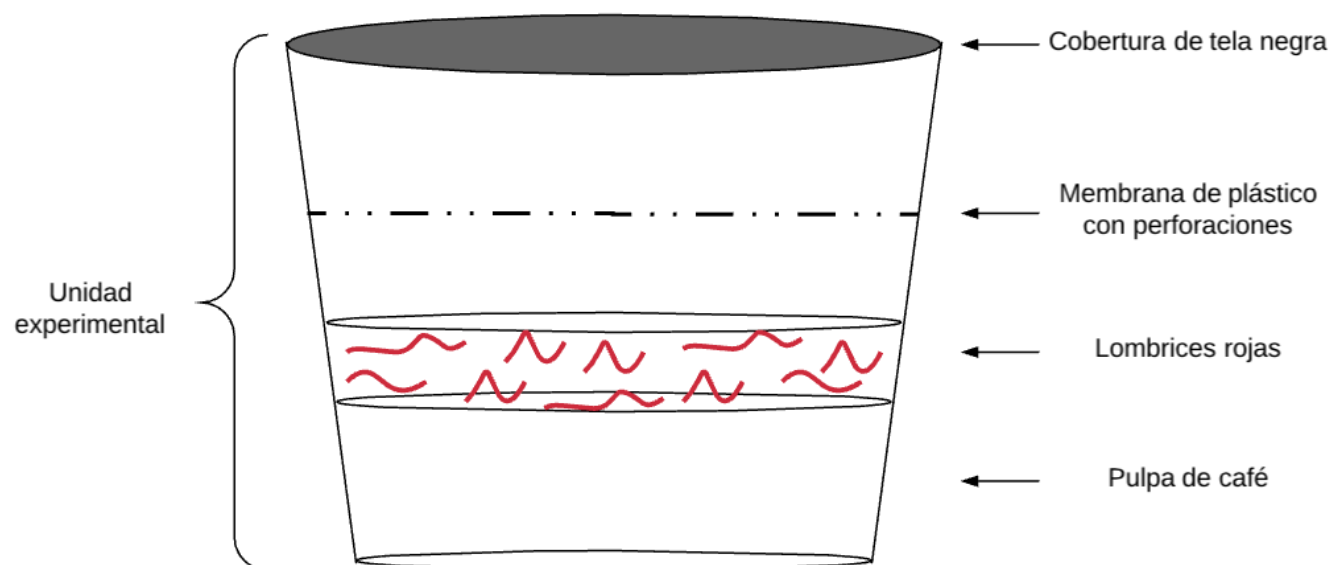
de Lombricompostaje del INECOL. El sustrato contenía una diversidad de larvas, insectos, platelmintos, entre otros organismos que podrían o no tener un efecto en las variables de interés, por lo que se procedió a su esterilización a 121°C por 15 minutos. La humedad fue ajustada a un nivel óptimo 70% (Capistrán *et al.*, 2001).

Como **nutriente suplementario**, se utilizó polvo de caparazones de jaiba (PCJ; Figura 2.1). Los caparazones fueron adquiridos en la zona centro de Xalapa con comerciantes locales. Una vez separados de las vísceras, los caparazones fueron transportados al Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana donde se lavaron con agua corriente para remover otros tejidos y excremento. Posteriormente, se colocaron en una estufa de desecación a 100°C y, tras 20 minutos y se molieron en un sistema Moulinex “La Moulinette 1, 2, 3” hasta transformarlos un fino polvo. En estas condiciones el PCJ se almacenó a 4°C hasta su utilización en los experimentos.



**Figura 2.1.** Caparazones de quitina utilizados como nutriente suplementario en la etapa de lombricompostaje. Foto: Marycruz Álvarez J.

Cada unidad se tapó con una tapa plástica con 6 perforaciones (tamaño de poro de 0.3cm) para permitir el intercambio de gases y evitar evaporación, así como variaciones bruscas en el contenido de agua (figura 2.2).



**Figura 2.2.** Esquema de las unidades experimentales utilizadas durante la etapa de lombricompostaje.

El experimento fue establecido a través de un diseño de carácter monofactorial con cuatro niveles y cinco réplicas experimentales por tratamiento. El factor fue la cantidad de nutriente suplementario (PCJ): Control (cero gramos, Grupo 0G), tres gramos (Grupo 3G), seis gramos (Grupo 6G) y 9 gramos (Grupo 9G) por unidad experimental. A través de este experimento se probó la cantidad de nutriente suplementario que la población de lombrices podía tolerar. Los cultivos fueron incubados durante 42 días (período de 15 de julio 2016 a 29 de agosto 2016) sin luz, distribuidos totalmente al azar asegurando así la independencia de todas ellas. La temperatura se mantuvo a 20°C, monitoreada con termómetros ambientales. Debido a la alta mortalidad de lombrices registrada en este primer experimento se realizó un segundo cultivo (Cuadro 2.1; *vid* anexos).

El segundo experimento también tuvo un diseño monofactorial (cuatro niveles, cinco réplicas por tratamiento), en donde sólo se modificó la cantidad de nutriente suplementario (PCJ): Control (cero gramos, Grupo 0G), un gramo (Grupo 1G), dos gramos (Grupo 2G) y tres gramos (Grupo 3G) por unidad experimental, la unidad experimental (recipientes plásticos de forma cúbica de 10 cm de

longitud de arista) y la densidad poblacional de lombrices (50 individuos por unidad, es decir 5,000 individuos por metro cuadrado; Cuadro 2.2; *vid* anexos).

Los cultivos de los experimentos fueron incubados durante 42 días (período de 15 de diciembre 2016 a 26 de enero 2017) en ausencia de luz distribuidas totalmente al azar asegurando así la independencia de todas ellas. La temperatura se mantuvo a 20°C, monitoreada con termómetros ambientales. Las lombrices fueron contadas al final del experimento para constatar su supervivencia, misma que fue transformada a un índice de supervivencia de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Índice de supervivencia} = 100 \left( \frac{\text{No. final}}{\text{No. inicial}} \right)$$

### 3.3.2. Etapa 2: Proceso para la extracción del ExLom-P

Al concluir el proceso de lombricompostaje, se llevó a cabo la extracción acuosa a partir de la lombricomposta de los tratamientos que no afectaron la supervivencia de las lombrices. La extracción se llevó a cabo por maceración (suspensión de lombricomposta en agua) en donde, para mantener la independencia obtenida de cada unidad experimental, cada extracto se realizó en frascos estériles por separado, uno por cada unidad experimental del lombricompostaje, previa homogeneización de la lombricomposta. Para realizar esta extracción se utilizaron 5 g de lombricomposta por cada 25 ml de agua.

Usando la proporción de lombricomposta:agua mencionada anteriormente (5g/25ml) se probaron tres métodos de extracción a través de un experimento monofactorial completamente al azar en donde el factor fue el método de extracción con tres niveles: aireación, no aireación y decocción.

Método de aireación: Se siguió la metodología reportada por Arancon *et al.*, (2007); Xu *et al.*, (2012) y Marín *et al.*, (2013). La mezcla de lombricomposta y agua desionizada estéril fue agitada manualmente y se le incorporó una manguera para el suministro de aire mediante una bomba de pecera (Xu *et al.*, 2012). Tras 24h de incubación se retiró la manguera para permitir la sedimentación de la lombricomposta durante 30 minutos. Pasado este tiempo se procedió a la separación del extracto por decantación.

Método sin aereación: Para este caso se siguió la metodología reportada por Ingham (2002); Xu *et al.*, (2012) y Marín *et al.*, (2013). Tras mezclar manualmente la lombricomposta y el agua



desionizada estéril, se incubó durante 24 h. Pasado este tiempo se procedió a la separación del extracto por decantación.

Método de decocción: La mezcla de lombricomposta y agua desionizada estéril fue llevada a hervor durante 20 minutos. Posteriormente, se procedió a la separación del extracto y la fase sólida por filtración rápida a través de papel Whatman no. 1.

Una vez obtenidos los ExLom-Ps se procedió a la realización de los ensayos para comparar su efecto en la germinación de esporas de *H. vastatrix* mediante un diseño experimental completamente al azar en donde el factor fue el método de extracción a tres niveles (aireación, no aireación y decocción). Cada nivel contó con seis réplicas experimentales haciendo un total de 24 unidades experimentales incluyendo el control que consistió en la suspensión de esporas en agua estéril (Cuadro 2.3; *vid* anexos).

Tras estas pruebas y de acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionó el método sin aereación para la realización de la etapa 3.

3.3.3. Etapa 3: Fraccionamiento del ExLom-P, el rol de los microorganismos en la germinación de esporas de roya

#### **Experimento de esterilización de ExLom-P**

Con el propósito de evaluar el efecto de los microorganismos del ExLom-P en la germinación de esporas de roya sin afectar las sustancias termosensibles del extracto, se realizó un proceso de esterilización por filtración. Tomando en cuenta los resultados de la etapa 2, el ExLom-P obtenido mediante el tratamiento sin aireación se filtró a través microfiltros de fibra de vidrio (poro 0.2  $\mu\text{m}$ ) siguiendo la metodología de Cronin *et al.*, (1996) y Dianéz *et al.*, (2006).

Previo a la realización de este experimento se efectuó un ensayo para verificar la eficacia de la filtración en la eliminación de los microorganismos en el cual los extractos filtrados se inocularon cuatro cajas petri con agar Müeller-Hinton (medio de cultivo rico, esto es no selectivo y con nutrientes disponibles para diversos tipos de hongos y bacterias). Posteriormente, tras siete días de incubación a temperatura ambiente y en completa oscuridad, se inocularon las mismas cajas con ExLom-P no filtrado.

#### **Efecto de los microorganismos en la germinación de roya del café**

Una vez obtenidos los ExLom-Ps con y sin microorganismos, se procedió a comparar su efecto en la germinación de las esporas de roya de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar en donde los factores fueron la presencia de microorganismos a dos niveles (presencia y ausencia); y la cantidad de PCJ en lombricomposta a cuatro niveles (cero, uno, dos y tres gramos). Cada nivel contó con cinco réplicas experimentales haciendo un total de 45 unidades experimentales (Cuadro 2.5; *vid* anexos).

Para evaluar el efecto del ExLom-P obtenidos en las etapas 2 y 3 (método de extracción y fraccionamiento) relacionado con la germinación de roya del café a nivel *in vitro*, se establecieron experimentos factoriales según lo descrito en la etapa respectiva. Ambos experimentos se sujetaron a lo siguiente:

Los bioensayos de evaluación de germinación de las esporas de roya del café consistieron en la suspensión de 10,000 esporas en tres mililitros de cada tratamiento y un grupo control positivo con agua desionizada para lo cual se pesaron 0.0025 g de espora en una balanza analítica (marca SARTORIUS). La concentración de esporas fue constatada a través de conteos en cámara de

Neubauer para lo cual se tomaron alícuotas de 170 µl (capacidad de la cámara) y se procedió al conteo de esporas según metodología estándar de conteo de células<sup>2</sup> para lo cual se contabilizaron todas las esporas que se encontraran en los cuadros superior e inferior derecho e izquierdo de ambas rejillas de la cámara de Neubauer. El conteo total permitió estimar la cantidad de esporas según la fórmula predeterminada:

$$\text{No. de esporas} = \frac{\text{Esporas contadas} \times 10,000}{\text{Número de cuadros}}$$

Después de constatar el número de esporas en cada unidad experimental, se estimó la cantidad de esporas viables para el grupo positivo, es decir, las que germinaron, y el tiempo (días) que les tomó hacerlo. Cada tratamiento contó con seis réplicas experimentales que consistieron en frascos viales de 5 mililitros incubados durante 96 horas (cuatro días) en total oscuridad a 20°C.

Pasado el tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 170 µl para el conteo de esporas germinadas mediante la cámara de Neubauer. Estas observaciones se llevaron a cabo en un microscopio óptico (marca Leica).

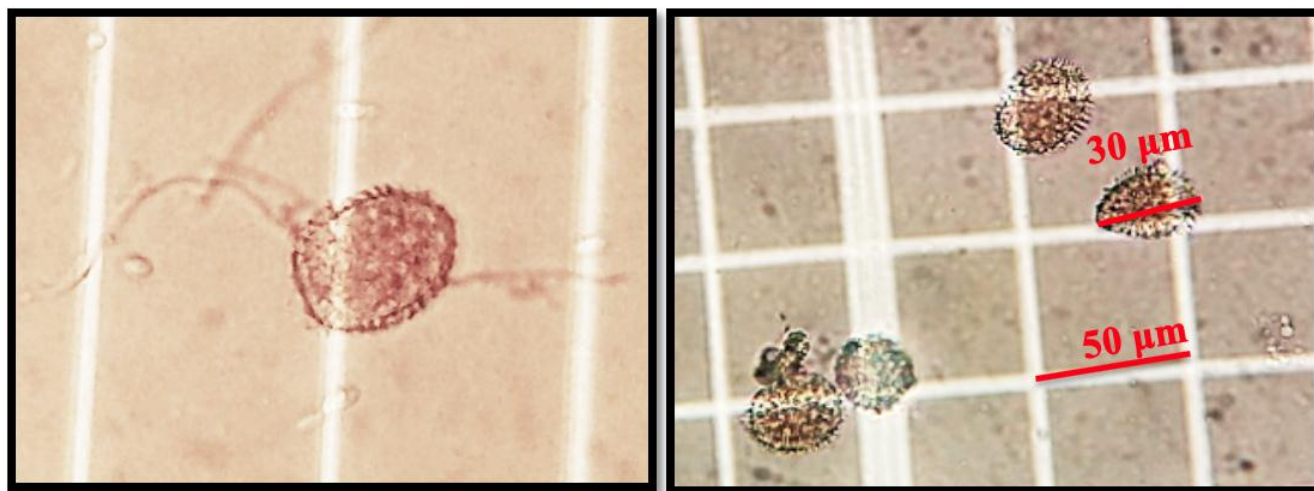
Las esporas fueron observadas con el objetivo de 40x y el porcentaje de germinación fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de germinación} = 100 \left( \frac{\text{Esporas germinadas}}{\text{Esporas en rejilla}} \right)$$

En donde: esporas germinadas se refiere a aquellas esporas de las cuales se observó la elongación de uno o varios tubos germinativos; esporas totales se refiere a la cantidad de esporas observadas dentro de la rejilla de conteo en la cámara de Neubauer (si la espora no se encontraba dentro de la rejilla, no fue considerada en el conteo; Figura 2.3).

---

<sup>2</sup> Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>



**Figura 2.3.** A la izquierda se muestra una espora de roya germinada. Su contraparte, la espora no-germinada se muestra a la derecha. Observaciones realizadas en microscopio óptico con el objetivo 40x, cada cuadro en la rejilla de la derecha mide 50  $\mu\text{m}$ .

### **Metodología de microscopía electrónica de barrido**

Para observar la posible interacción con microorganismos u otros efectos del ExLom-P en las esporas, las esporas expuestas a los diferentes tratamientos fueron observadas bajo microscopio electrónico de barrido. Para ello, las muestras fueron secadas en bajo vacío en un microscopio electrónico JEOL-JSM-5600 LV. Posteriormente se sombrearon con un equipo Denton de vacío modelo Desk V de oro-paladio. La observación y captura de imágenes final se llevó a cabo en el mismo microscopio electrónico JEOL-JSM-5600 LV donde se secaron las muestras a alto vacío.

#### **3.3.4. Etapa 4. Caracterización de ExLom-P supresor de germinación de roya**

##### **3.3.4.1. Análisis de nutrientes minerales, pH y conductividad eléctrica**

Los análisis para la valoración de los nutrientes en el ExLom-P fueron realizados por el Laboratorio de Análisis Químicos de Suelo, Agua y Planta (LAQSAP) del INECOL, A. C. Se cuantificaron nutrientes totales y solubles así como el valor de pH y conductividad eléctrica. El N total se cuantificó a través del método semimicro-kjeldhal, método AS-25-2000 y el Nitrógeno inorgánico extraíble con KCl 2N, método AS-08-2000, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Para Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Pb, Cd, Cr y K totales se hizo una

digestión húmeda con ácido perclórico y ácido nítrico en relación 1:2 (Allan, 1971). Para el fósforo, se llevó a cabo una cuantificación colorimétrica con vanadato-molibdato. Las muestras se analizaron por absorción atómica en el espectrómetro de absorción secuencial atómica rápida Varian modelo AA240FS según especificaciones expuestas en Rodríguez (2017).

#### **3.3.4.2. Cuantificación de enzima quitinasa**

La actividad específica quitinasa fue evaluada a través del kit de ensayo Quitinase Kit Essay (Sigma-Aldrich). Se utilizaron 0.9 µl de 4-Nitrofenil N-acetil β D glucosaminida (no. de catálogo N9376) como sustrato de reacción de la enzima. Como control positivo se utilizaron 10 µl de la enzima quitinasa de *Trichoderma viridae* (no. de catálogo C6242), este volumen (tanto en el tratamiento control como en cada muestra) fue agregado a los 90 µl de sustrato. La reacción convirtió al sustrato en *p-nitrofenol* el cual, a su vez, fue oxidado con carbonato de sodio tras el tiempo de incubación (15 minutos en este trabajo) al ion p-nitrofenilato de color amarillo cuya absorbancia fue leída a 405 nm en un espectrómetro de luz UV/VIS VELAB. Se llevaron a cabo 10 réplicas por cada ExLom-P derivado de cada concentración de PCJ según el diseño (Cuadro 2.2; *vid anexos*).

#### **3.3.4.3. Análisis químico a través de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas de alta resolución**

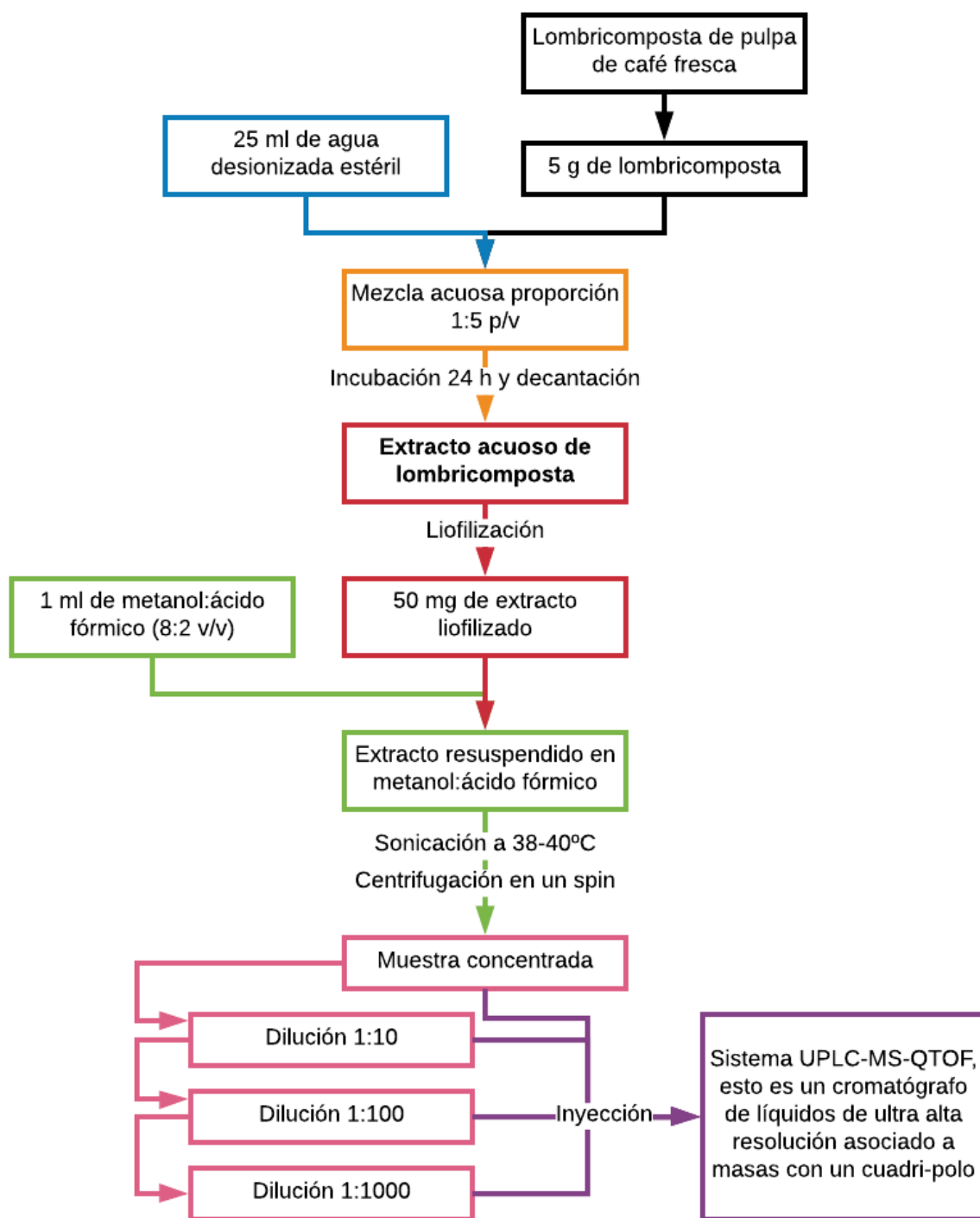
##### **3.3.4.3.1. Preparación de muestras**

El ácido abscísico, ácido salicílico y ácido jasmónico en el ExLom-P fueron cuantificados en el laboratorio de química de productos naturales del Instituto de Ecología, A. C. mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución y espectrometría de masas.

Para ello, se tomaron tres muestras independientes de 50 mg de ExLom-P liofilizado, proveniente de tres de las cinco réplicas experimentales independientes de los ExLom-P sin filtrar y sin quitina. Cada una de las tres muestras independientes de ExLom-P liofilizado fueron resuspendidas en un 1 mL de una solución de metanol:ácido fórmico (8:2 vol/vol) y sonicadas 3 veces durante 10 minutos con intervalos de 5 minutos entre cada sonicación para evitar el calentamiento de la muestra, la cual se mantuvo en un rango de temperatura de 38 – 40 °C. Al terminar el proceso de sonicación se procedió a centrifugar las muestras con un “spin” durante 10 minutos, tras lo cual se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 con la misma solución de metanol: ácido fórmico (Figura 2.4).

#### **3.3.4.3.2. Cuantificación de inductores de respuesta sistémica (ácido abscísico, salicílico y jasmónico; RSI)**

Para la identificación y cuantificación de ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) se utilizó un sistema de cromatografía de alta resolución (UPLC) modelo Clase I de Waters, acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución modelo Synapt HDMS de Waters. La separación cromatográfica se realizó en una columna Acquity BEH (1.7 mm, 2.1 x 50 mm), con una temperatura del horno de columna a 40 °C y del automuestreador de 15 °C. La fase móvil consistió en (A) agua y (B) acetonitrilo (90%) ambas con 0.1% de ácido fórmico (SIGMA). Las condiciones del gradiente de la fase móvil fueron de 0 a 15 min gradiente lineal de 1 - 95% de B, 15 -16 min isocrático al 95% B, 16 - 17 min 95 -1% de B en un gradiente lineal, 17-20 min, isocrático a 1% de B (tiempo total de corrida 20 min). El flujo fue de 0.1 mL/min y se inyectó 1 µL de muestra.



**Figura 2.4.** Diagrama de flujo de extracción de compuestos de lombricomposta y preparación de muestras para análisis en UPLC en el estudio dirigido y no-dirigido. Los diferentes colores son indicadores de cambios de etapa en la extracción.

El espectrómetro de masas se realizó con una fuente de ionización por electrospray en modo negativo con voltajes del capilar, del cono de muestra y de “offset” de 3000, 40 y 80 V,

respectivamente. La temperatura de la fuente fue de 100 °C y la temperatura de desolvatación fue de 20 °C. El flujo del gas de desolvatación fue de 600 L por hora y la presión del nebulizador fue 6.5 Bar. Se utilizó Leucina-encefalina como estándar de referencia (554.2615, [M-H]<sup>+</sup>).

Las transiciones del método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) fueron 263.1281>153.0914, 137.0239>93.035 y 209.1178>165.2183 para el ABA, SA y JA, respectivamente. La energía de colisión para cada compuesto fue de 10 V. La información fue adquirida y procesada con los softwares MasLynx (version 4.1) y TargetLynx (version 4.1).

Para cuantificar, se contruyeron curvas de calibración y modelos de regresión para cada compuesto con coeficientes de determinación de 0.99 en el rango de cuantificación de 0.5-18 µM.



### 3.3.4.3.3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos a través de estudio dirigido

#### Condiciones de cromatografía

Los datos fueron obtenidos con un UPLC 1290 de Agilent acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo 6460 de Agilent. Las fases móviles fueron agua con 0.1% de ácido fórmico (A) y una solución de acetonitrilo al 90% (B) con 0.1% de ácido fórmico, ambos grado MS. El perfil de la elución se describe en el cuadro 2.6.

El flujo fue  $0.1 \text{ mL min}^{-1}$ . El volumen de inyección fue de  $1 \mu\text{L}$ . La columna fue una Zorbax SB-C18,  $2.1 \times 50\text{mm}$ , 1.8 Microns de Agilent. La temperatura de la columna fue  $40 \pm 0.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Cuadro 2.6.** Perfiles de elución según tiempo de cromatografía.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	99	1
40	60	40
42	10	90
45	10	90
45.50	99	1
47	99	1

#### Condiciones del espectrómetro de masas

El análisis por espectrometría de masas se llevó a cabo a una temperatura de gas de  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$  con un flujo de  $5 \text{ L min}^{-1}$ . El nebulizador se mantuvo a una presión de 45 psi. La temperatura de gas “sheath” fue de  $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$  con un flujo de  $11 \text{ L min}^{-1}$ . El voltaje utilizado para la espectrometría positiva y negativa fue de 3,500 V; y el voltaje de boquilla fue de 500 V. El protocolo utilizado fue MRM dinámico. Las condiciones para cada compuesto son descritas en el cuadro 2.7.

**Cuadro 2.7.** Compuestos fenólicos cuantificados a través de un estudio dirigido en ExLom-P.

Compuesto	Ion precursor	Ion producto	Tiempo de retención (min)	Ventana de retención (± min)	Voltaje de fragmentación (V)	Energía de colisión (V)	Polaridad
1. Ácido shikímico <sup>1</sup>	173.1	111.1	1.7	0.5	100	10	Negativa
2. Ácido gálico <sup>2</sup>	169	125.2	3.8	0.5	100	10	Negativa
3. Ácido protocatechuico <sup>1</sup>	153	109.1	6.4	0.25	100	10	Negativa
4. Ácido 4-Hidroxibenzoico <sup>1</sup>	137.1	92.8	9.11	0.5	100	10	Negativa
5. Ácido gentísico <sup>1</sup>	153	109	9.2	0.25	100	10	Negativa
6. (-)-Epigallocatequina <sup>3</sup>	305.1	125	10.44	0.5	140	20	Negativa
7. Ácido 4-Hidroxifenilacético <sup>4</sup>	107.1	77	10.52	0.5	140	20	Positiva
8. (+)-Catequina <sup>2</sup>	291	138.9	11.2	0.5	100	10	Positiva
9. Ácido vanílico <sup>1</sup>	169	93.03	11.81	0.5	100	10	Positiva
10. Scopolina <sup>5</sup>	355.1	193	11.87	0.5	100	20	Positiva
11. Ácido clorogénico <sup>1</sup>	355.1	163.03	12.12	0.3	100	10	Positiva
12. Ácido cafeico <sup>1</sup>	181.04	163.03	12.24	0.5	100	10	Positiva
13. Procianidina B2 <sup>1</sup>	577.1	425.1	13.69	0.5	100	10	Negativa
14. Kuromanina <sup>1</sup>	449	286.9	14.24	0.5	140	30	Positiva
15. (-)-Epicatequina <sup>2</sup>	291	138.8	14.48	0.5	100	10	Positiva
16. Vainillina <sup>1</sup>	153	124.9	14.99	0.5	100	10	Positiva
17. Mangiferina <sup>2</sup>	423	302.8	15.18	0.5	100	10	Positiva
18. Queracianina <sup>2</sup>	595.2	287.1	15.2	0.5	100	20	Positiva
19. Ácido 4-cumárico <sup>1</sup>	165.05	147.04	16.22	0.25	100	10	Positiva
20. (-)-Galato galocatequina <sup>2</sup>	458.9	139	16.57	0.5	80	20	Positiva
21. Umbeliferona <sup>1</sup>	163	107	17.1	0.5	100	30	Positiva
22. Quercetin-3,4-di-O-glucosido <sup>1</sup>	627	302.9	17.87	0.5	100	10	Positiva
23. Scopoletina <sup>1</sup>	193	133	18.44	0.5	100	10	Positiva

Continúa, siguiente página

Compuesto	Ion precursor	Ion producto	Tiempo de retención (min)	Ventana de retención (± min)	Voltaje de fragmentación (V)	Energía de colisión (V)	Polaridad
24. Ácido 3-Cumárico <sup>1</sup>	165.05	147.04	18.7	0.25	100	10	Positiva
25. Ácido ferúlico <sup>1</sup>	195.1	145.02	19.18	0.5	100	20	Positiva
26. Ácido sinápico <sup>1</sup>	225.1	207.1	19.57	0.5	100	10	Positiva
27. Galato epicatequina <sup>3</sup>	443.1	123	19.91	0.5	100	10	Positiva
28. Miricitrina <sup>1</sup>	465	318.9	20.25	0.5	100	10	Positiva
29. Ácido elágico <sup>1</sup>	301	145	20.36	0.5	100	40	Negativa
30. Quercetin-3-D-galactósido <sup>2</sup>	465	302.9	20.6	0.5	100	10	Positiva
31. Rutin <sup>2</sup>	611	302.9	20.65	0.5	100	10	Positiva
32. Quercetin-3-glucósido <sup>2</sup>	465	303	21.19	0.5	100	10	Positiva
33. Luteolin-7-O-glucósido <sup>1</sup>	449	287	21.4	0.6	100	10	Positiva
34. Ácido <i>p</i> -anísico <sup>4</sup>	153.1	109	22.21	0.5	120	5	Positiva
35. Penta-O-galoi-β-D-glucosa <sup>2</sup>	771.1	153	22.27	0.5	100	20	Positiva
36. Ácido 2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico <sup>2</sup>	197	179	23.43	0.5	80	5	Positiva
37. Kaempferol-3-O-glucósido <sup>1</sup>	449	286.9	23.64	0.5	100	10	Positiva
38. Naringina <sup>1</sup>	273	153	23.64	0.5	120	10	Positiva
39. Quercitrina <sup>1</sup>	449.1	303.1	23.71	0.5	100	10	Positiva
40. Hesperidina <sup>1</sup>	609.1	301.1	24.55	0.5	100	20	Negativa
41. Myricetina <sup>1</sup>	317	179	24.64	0.5	100	10	Negativa
42. Ácido rosmarínico <sup>1</sup>	361.1	163	24.85	0.5	100	10	Positiva
43. Floridzina <sup>1</sup>	435	272.9	25.21	0.5	100	10	Negativa
44. <i>Trans</i> -resveratrol <sup>2</sup>	229.1	135	25.86	0.5	100	10	Positiva
45. Ácido <i>trans</i> -cinámico <sup>1</sup>	149.1	131	28.5	0.5	100	10	Positiva
46. Cirsimarina <sup>6</sup>	477	314.9	29.4	0.5	100	10	Positiva
47. Quercetina <sup>2</sup>	302.9	153.1	29.7	0.5	100	35	Positiva
48. Luteolina <sup>1</sup>	287.1	153	30.09	0.3	100	30	Positiva
49. Psoralen <sup>1</sup>	187	131.1	31.4	0.5	100	20	Positiva
50. Angelicina <sup>2</sup>	187	131.1	32.74	0.5	100	20	Positiva

Continúa, siguiente página.

Compuesto	Ion precursor	Ion producto	Tiempo de retención (min)	Ventana de retención (± min)	Voltaje de fragmentación (V)	Energía de colisión (V)	Polaridad
51. Naringenina <sup>1</sup>	271	151	32.83	0.5	100	10	Negativa
52. Apigenina <sup>1</sup>	271	153	34.1	0.5	100	30	Positiva
53. Kaempferol <sup>1</sup>	287.1	153	34.79	0.3	100	30	Positiva
54. Hesperetina <sup>1</sup>	303.1	177.1	34.8	0.5	100	20	Positiva
55. Citropten <sup>4</sup>	207.06	192.04	36.11	0.5	100	20	Positiva
56. Ácido nordihidro-guaiaarético <sup>1</sup>	303	193.1	42.36	0.5	100	10	Positiva
57. Chrysin <sup>1</sup>	255.1	153	43.13	0.5	100	40	Positiva
58. Kaempferido <sup>1</sup>	301	258.2	43.5	0.5	100	20	Positiva
59. Emodina <sup>1</sup>	269	225	44.2	0.5	150	20	Negativa
60. Crisofanol <sup>1</sup>	255.1	153	45.3	0.2	100	40	Positiva

El voltaje del acelerador de la celda fue de 7 V para cada compuesto. <sup>1</sup>Compuestos comprados a Extrasynthese (Lyon, Francia). <sup>2</sup>Compuestos comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). <sup>3</sup>Compuestos comprados a Cayman Chemical Company (Michigan, EUA). <sup>4</sup>Compuestos donados amablemente por el Dr. Thor Arnason (Universidad de Ottawa). <sup>5</sup>Compuestos aislados en el laboratorio.

## Cuantificación

Se realizó una curva de calibración para cada compuesto en una concentración de 0.5 a 17  $\mu\text{M}$ . En el siguiente cuadro se muestra el rango de cuantificación y los valores del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) para cada compuesto (cuadro 2.8).

**Cuadro 2.8.** Rango de cuantificación de compuestos fenólicos en ExLom-P y el coeficiente de determinación.

Compuesto	Rango de cuantificación ( $\mu\text{M}$ )	$r^2$	Compuesto	Rango de cuantificación ( $\mu\text{M}$ )	$r^2$
Ácido shikímico	0.5 - 17	0.99	Rutin	1 - 17	0.99
Ácido gálico	1 - 17	0.99	Quercetin-3-glucósido	1 - 17	0.99
Ácido protocatechuico	1 - 17	0.99	Luteolin-7- <i>O</i> -glucósido	1 - 17	0.99
Ácido 4-Hidroxibenzoico	1 - 17	0.99	Ácido <i>p</i> -anísico	1 - 17	0.99
Ácido gentísico	1 - 17	0.99	Penta- <i>O</i> -galloil- $\beta$ -D-glucosa	1 - 17	0.99
(-)-Epigallocatequina	1 - 17	0.99	Ácido 2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico	0.5 - 17	0.99
Ácido 4-Hidroxifenilacético	0.5 - 17	0.99	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	0.5 - 17	0.99
(+)-Catequina	1 - 17	0.99	Naringina	1 - 17	0.99
Ácido vanílico	1 - 17	0.99	Quercitrina	1 - 17	0.99
Scopolina	1 - 17	0.99	Hesperidina	0.5 - 17	0.99
Ácido clorogénico	1 - 17	0.99	Myricetina	1 - 17	0.99
Ácido cafeico	1 - 17	0.99	Ácido rosmarínico	1 - 17	0.99
Procianidina B2	1 - 17	0.99	Floridzina	1 - 17	0.99
Kuromanina	1 - 17	0.99	<i>Trans</i> -resveratrol	1 - 17	0.99
(-)-Epicatequina	1 - 17	0.99	Ácido <i>trans</i> -cinámico	1 - 17	0.99
Vainillina	1 - 17	0.99	Cirsimarina	1 - 17	0.99
Mangiferina	0.5 - 17	0.99	Quercetina	1 - 17	0.99
Queracianina	1 - 17	0.96	Luteolina	1 - 17	0.99
Ácido 4-cumárico	1 - 17	0.99	Psoralen	1 - 17	0.99
(-)-Galato galocatequina	1 - 17	0.99	Angelicina	0.5 - 17	0.99
Umbeliferona	1 - 17	0.99	Naringenina	1 - 17	0.99
Quercetin-3,4-di- <i>O</i> -glucosido	1 - 17	0.99	Apigenina	1 - 17	0.99
Scopoletina	1 - 17	0.99	Kaempferol	1 - 17	0.99
Ácido 3-Cumárico	1 - 17	0.99	Hesperetina	1 - 17	0.99
Ácido ferúlico	1 - 17	0.99	Citropten	3 - 17	0.99
Ácido sinápico	1 - 17	0.99	Ácido nordihidro-guaiarético	1 - 17	0.99
Galato epicatequina	1 - 17	0.99	Chrysin	1 - 17	0.99
Miricitrina	1 - 17	0.99	Kaempferido	0.5 - 17	0.99
Ácido elágic	3 - 17	0.99	Emodina	1 - 17	0.99
Quercetin-3-D-galactósido	1 - 17	0.99	Crisofanol	1 - 17	0.99

No se requirieron diluciones de la muestra pues la concentración de los compuestos fenólicos concentración siempre se ubicó dentro del rango de cuantificación.

## Identificación tentativa de compuestos, estudio no dirigido

Para la identificación de moléculas a través del estudio no-dirigido, las muestras fueron analizadas a través del sistema de cromatografía-Espectrometría de masas descrito en la sección de análisis de inductores de respuesta sistémica. La cromatografía fue llevada a cabo en una columna Acquity

BEH (1.7 mm, 2.1 x 50 mm) con temperatura de muestra y de columna de 50 y 15 °C, respectivamente. La fase móvil consistió en (A) agua y (B) acetonitrilo (90%), ambos con 0.1% de ácido fórmico (SIGMA).

Las condiciones del gradiente de las fases móviles fueron 0-15 min, gradiente lineal de 1-80% de B, 15-16 min, gradiente lineal de 80-99% de B, 16-17 min, 99% de B isocrático, 17-19 min, gradiente lineal de 99-1% de B (con un tiempo total de corrida de 20 min). El flujo fue de 0.1 mL min<sup>-1</sup> y se inyectó 1 µL de muestra. El análisis de espectrometría de masas fue realizado con una fuente de ionización electrospray en modo positivo y negativo con voltajes del capilar, del cono de muestra y de “offset” de 3000, 40 y 80 V, respectivamente.

La temperatura de la fuente fue de 100 °C y la temperatura de desolvatación fue de 20 °C. El flujo del gas de desolvatación fue de 600 L por hora y la presión del nebulizador fue 6.5 Bar. Se utilizó Leucina-encefalina como estándar de referencia (556.2771, [M+H]<sup>+</sup>; 554.2615, [M-H]<sup>-</sup>). Las condiciones utilizadas para los análisis de espectrometría de masas fueron: rango de masa 50-1200 Da, función 1 CE, 6 V, función 2 CER 10-30 V, tiempo de escaneo 0.5 segundos.

Los datos fueron obtenidos y procesados con MassLynx (version 4.1) e ingresados en la base de datos METLIN para buscar masas y patrones de fragmentación semejantes con un error máximo permitido de 5 ppm. Los resultados de la búsqueda se enlistaron y contrastaron con reportes en revistas científicas indexadas. Aquellas moléculas aisladas o identificadas en matrices semejantes a la composta (suelos, raíces o plantas) se consideraron como identificación tentativa.

### 3.4. Análisis estadísticos

#### 3.4.1. Supervivencia de lombrices

Los cultivos de lombrices tuvieron como variable de respuesta el índice de supervivencia. Para su análisis se llevó a cabo una exploración inicial con la prueba de Shapiro-Wilk para establecer si la variable era o no normal ( $\alpha = 0.05$ ). Al tratarse de un conjunto de datos no-paramétricos la variable fue transformada a un nuevo vector de datos ordinales el cual fue sometido a un análisis de varianza que identificó diferencias significativas entre los grupos [ $F_{(182.7, 4.65)} = 39.29$  ( $P < 0.0001$ )]. Con base en este resultado se llevó a cabo una prueba *post hoc* de diferencia mínima honesta de Tukey para discernir los grupos que eran significativamente diferentes entre sí ( $\alpha = 0.05$ ).

Para el segundo experimento no se llevó a cabo análisis estadístico ya que en todos los grupos sobrevivieron en totalidad. Del segundo ensayo se obtuvo la lombricomposta para las subsecuentes pruebas del trabajo.

#### 3.4.2. Bioensayos de germinación de esporas de roya

En todos los bioensayos de germinación se llevó a cabo una exploración inicial de datos con la prueba de Shapiro-Wilk para establecer si la variable tenía o no distribución normal. Al no poder garantizar supuestos de distribución normal (Shapiro-Wilk a un  $\alpha = 0.05$ ) se llevó a cabo una transformación a datos ordinales (Conover e Iman, 1981; Aceves-Aparicio *et al.*, 2018). Posibilitando así, aplicar un análisis de varianza de una vía para la etapa 2 y de dos vías para la etapa 3; así como una prueba *post hoc* de diferencia mínima honesta de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Las gráficas correspondientes fueron realizadas con datos no transformados.

#### 3.4.3. Actividad de enzima quitinasa

Para el análisis de los valores de la actividad específica de quitinasa se realizó una exploración inicial de datos con la prueba de Shapiro-Wilk para establecer la normalidad de la variable. La variable presentó una distribución normal ( $P > 0.05$ ) y homocedasticidad (probada a través de Bartlett  $P > 0.05$ ) por lo que se procedió a realizar un análisis de varianza de una vía ( $\alpha = 0.05$ ).

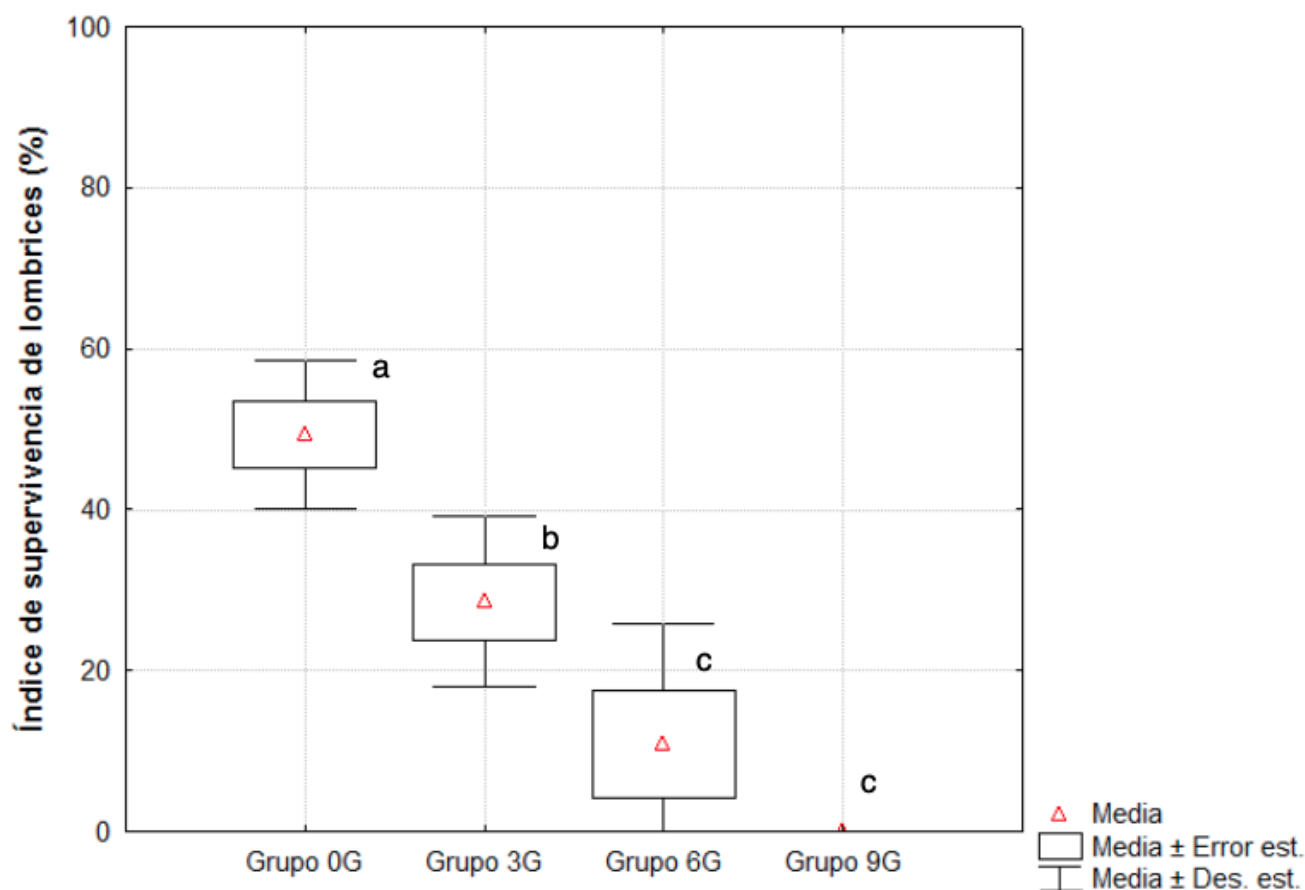
Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa R 3.3.2 con apoyo de R studio. Las gráficas correspondientes se llevaron a cabo en el programa Statistica 3.0.

### 3.5. Resultados

#### 3.5.1. Etapa 1. Proceso de lombricompostaje

##### Supervivencia de lombrices

Durante el primer cultivo de lombrices todos los tratamientos fueron diferentes entre sí [ $F_{(182.7, 4.65)} = 39.29$ ,  $P < 0.01$ ] a un  $\alpha = 0.05$ , con la excepción del Grupo 6G y el Grupo 9G ( $P > 0.1$ ), cuyos índices de supervivencia fueron los más bajos (Grupo 6G cercano a cero y Grupo 9G cero) manteniendo la materia orgánica con una consistencia heterogénea.



**Figura 2.5.** Índice de supervivencia de cultivo de lombrices con una densidad poblacional de 29,000 individuos  $m^2$  expuestas a cuatro diferentes niveles de PCJ (Grupo 0G: sin quitina; Grupo 3G: 3 g de quitina por unidad experimental; Grupo 6G: 6 g de quitina por unidad experimental; y Grupo 9G: 9 g de quitina por unidad experimental). Letras diferentes indican diferencias significativas.



Es decir, las condiciones de lombricompostaje fueron negativas (atribuible a una densidad poblacional demasiado alta) siendo que incluso el grupo control positivo (que únicamente tenía pulpa de café) tuvo una supervivencia aproximada del 50% (Figura 2.5).

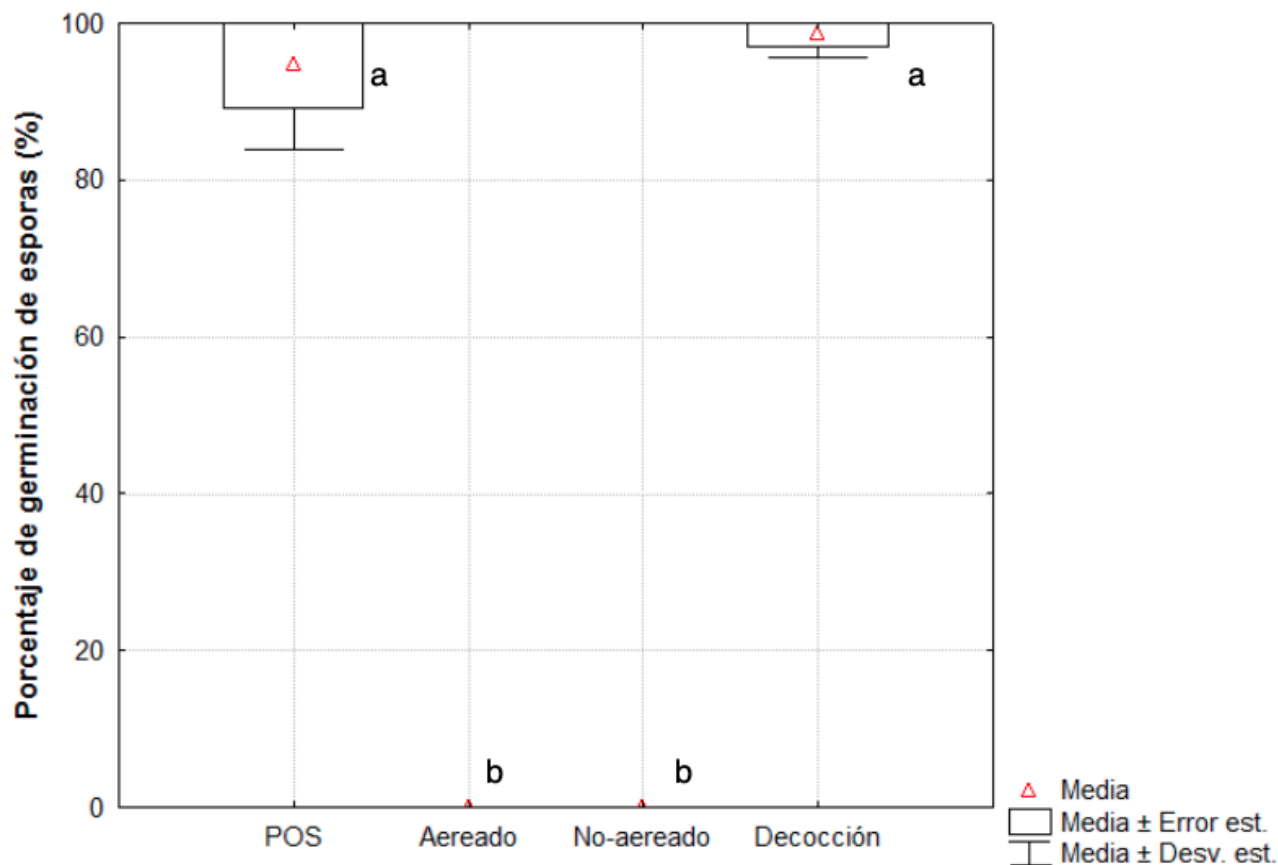
En lo que respecta al segundo cultivo de lombricompostaje, se consiguió una lombricomposta cuya materia orgánica inicial fue irreconocible. Tras 42 días de procesamiento no logró identificarse la pulpa de café ni los fragmentos de PCJ en ningún tratamiento. Así mismo se contabilizaron 50 lombrices (100% de supervivencia) y capullos en todos los tratamientos por lo que no se llevó a cabo comparación estadística alguna, determinándose así que todas las dosis de PCJ empleadas a una densidad de 50 lombrices por unidad experimental tuvieron una respuesta apropiada en el lombricompostaje de pulpa de café y para la supervivencia de las poblaciones de lombrices. Como producto de este proceso de lombricompostaje se obtuvieron lombricompostas etiquetadas como 0G, 1G, 2G y 3G.

### 3.5.2. Etapa 2. Proceso para la extracción del ExLom-P

#### **Método de extracción: Aereación, no aereación o decocción y su efecto en la germinación de esporas de roya**

Los métodos de extracción del ExLom-P, todos derivados de lombricomposta sin PCJ, tuvieron un efecto diferente sobre la germinación de esporas [ $F_{(85.38, 2.03)} = 42.03$ ,  $P < 0.01$ ]. Tanto el ExLom-P proveniente del método aireado como el del método no aireado suprimieron totalmente la germinación de esporas de roya y fueron iguales entre sí ( $P > 0.1$ ). Por su parte, el grupo control positivo y el ExLom-P del método de decocción tuvieron un porcentaje de germinación de esporas mayor al 90%, sin que se detectaran diferencias significativas entre ambos ( $P > 0.1$ ). En otras palabras, el ExLom-P es eficaz en la supresión de la germinación de las esporas de la roya al utilizar el método aireado y el no aireado para su extracción. Sin embargo, el ExLom-P proveniente del método de decocción no tuvo efecto en la disminución de la germinación de la roya probablemente por la desnaturalización de biomoléculas y microorganismos, por lo que no fue utilizado en las siguientes etapas (Figura 2.6).

Aún cuando el extracto aireado y el no-aireado suprimieron la germinación de las esporas de *H. vastatrix* en la misma medida ( $P > 0.1$ ), se decidió utilizar el último en las siguientes etapas del estudio dado que implica menos tecnología y no requiere de energía para bombear aire durante la incubación del ExLom-P.

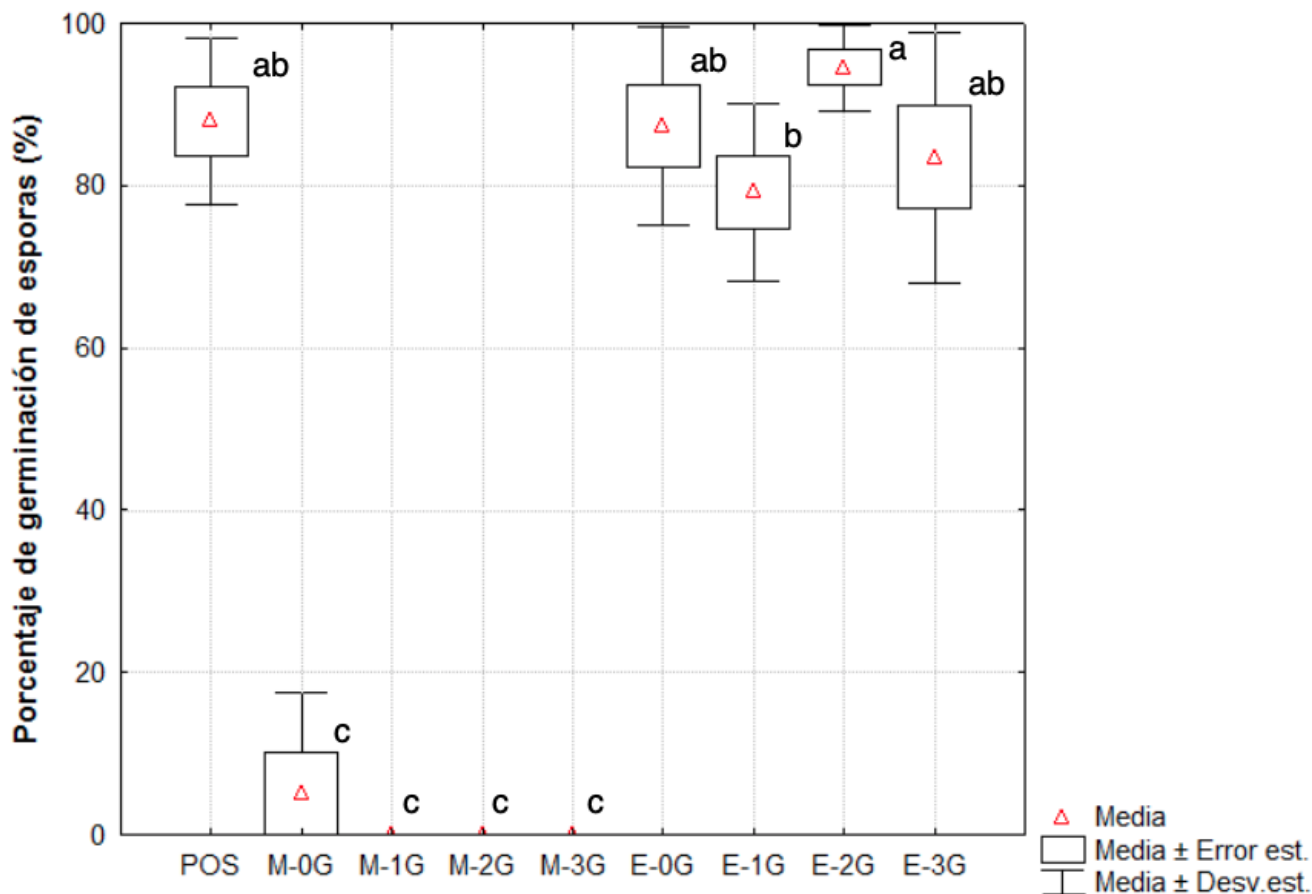


**Figura 2.6.** Supresión de la germinación de esporas de roya al exponerlas a ExLom-P (sin adición de PCJ) derivado de tres métodos: aireado, no-aireado y decocción. Se agregó el grupo POS como control positivo (agua desionizada estéril). Letras diferentes indican diferencias significativas.

### 3.5.3. Etapa 3: Fraccionamiento del ExLom-P, el rol de los microorganismos en la germinación de esporas de roya

Al llevar a cabo el fraccionamiento del ExLom-P (esterilizarlo a través de microfiltros) y probar su efecto en la germinación de esporas de roya se observó que los microorganismos y la cantidad de PCJ, como factores, no interactúan entre sí [ $F_{(59, 22)} = 2.78$ ,  $P > 0.05$ ], es decir, no guardan relación para aumentar o disminuir la germinación de esporas de roya. Sin embargo, aunque no interactúan ambos factores son relevantes en la germinación de la roya [ $F_{(6912, 22)} = 318.8$ ,  $P < 0.0001$  para el factor microorganismos y  $F_{(71, 22)} = 3.292$ ,  $P < 0.05$  para el factor PCJ].

Es importante recalcar que, de acuerdo al modelo estadístico, las diferencias en el porcentaje de germinación de esporas se deben, más a la presencia de microorganismos ( $P < 0.001$ ) que a la adición de PCJ ( $P < 0.05$ ).



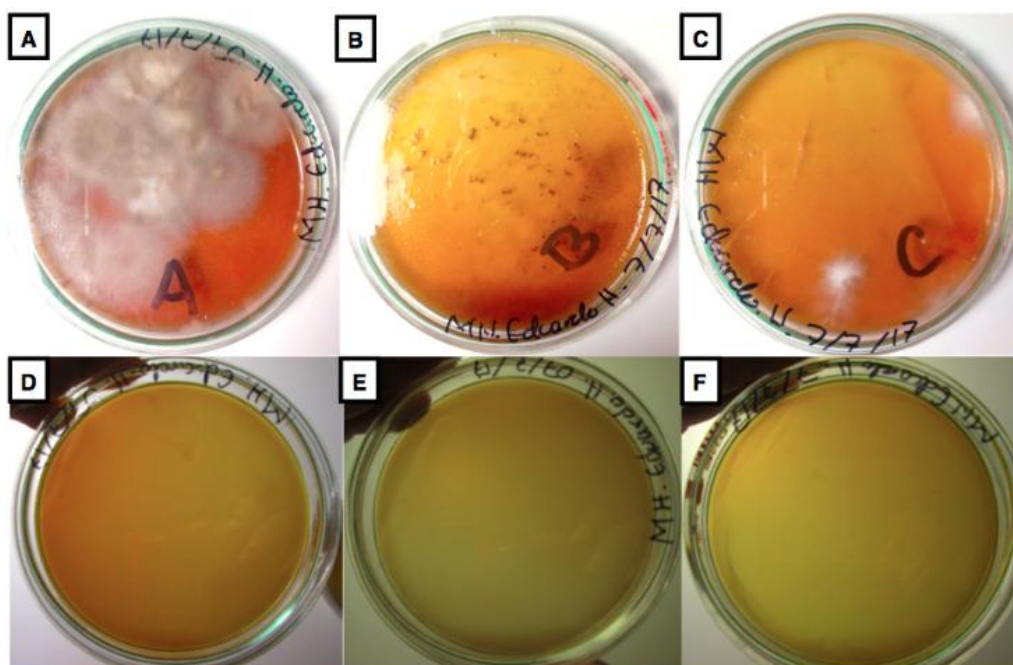
**Figura 2.7.** Efecto de microorganismos en la disminución de la germinación de la roya. En donde, POS es el control positivo; 0G, 1G, 2G y 3G indican la masa de PCJ agregada a la lombricomposta; M extractos no filtrados y E para extractos estériles o filtrados. Letras diferentes indican diferencias significativas.

En suma, la evidencia indica que tanto la cantidad de quitina agregada en el proceso de lombricompostaje como la presencia/ausencia de microorganismos en el extracto tienen un efecto en la germinación de esporas de roya (Figura 2.7). Sin embargo, la diferencia derivada de los niveles de PCJ en los extractos de lombricomposta se presentó entre los grupos E-1G y E-2G ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, no es posible diferenciar estos grupos de resultados obtenido en el grupo control positivo ( $P > 0.05$ ). Por lo tanto, el tratamiento con ExLom-P estéril derivado de una lombricomposta con uno o dos gramos de PCJ (aunque diferentes entre sí) no tienen efecto en la disminución de la germinación de la roya, ya que esta germina tanto como lo hace en el agua pura. Por consiguiente, ningún tratamiento con ExLom-P filtrado es apropiado para posteriores pruebas de germinación.

Vale la pena recalcar que la variabilidad en los mencionados grupos E-1G y E-2G (estériles) es la razón de la significancia que presentó el factor “cantidad de PCJ” ( $P < 0.05$ ) en el análisis de varianza de factores aditivos. En otras palabras, el factor quitina sólo es significativo por el hecho de hacer diferentes entre sí a dos grupos iguales al control positivo, por ende, no es relevante para efectos de la disminución de la germinación de esporas de roya. Esto evidencia la importancia de los microorganismos, dado que en los tratamientos sin filtración se obtuvieron porcentajes de germinación muy bajos o nulos y fueron iguales entre sí ( $P > 0.1$ ).

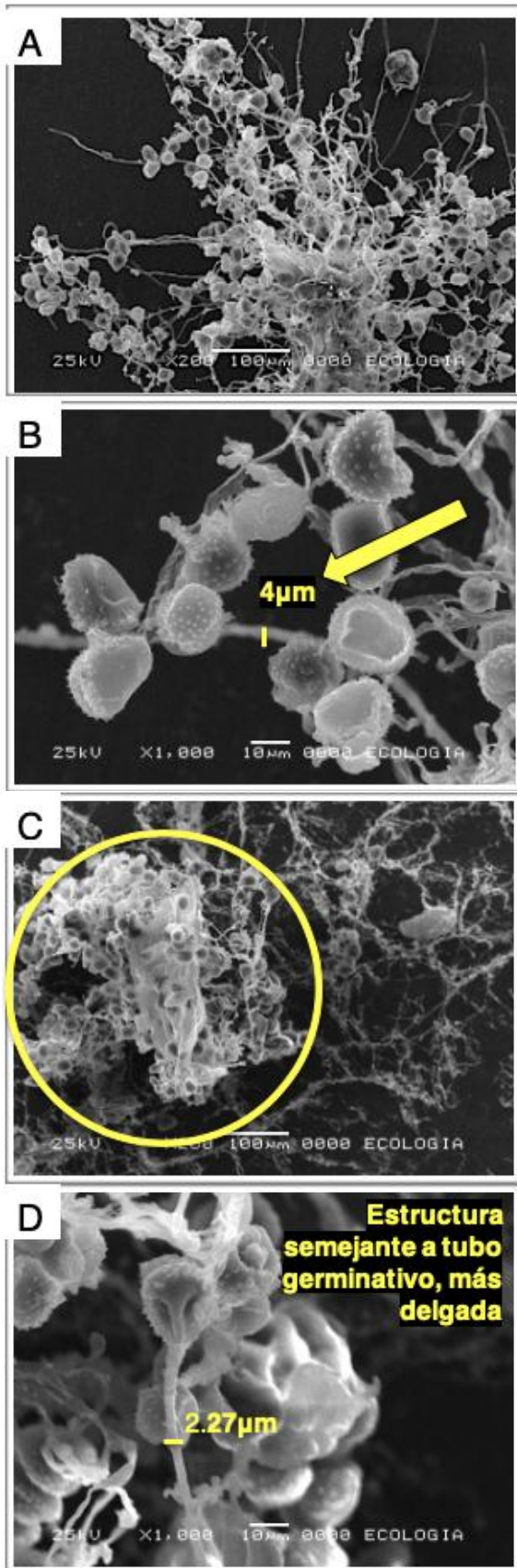
### Esterilización por filtración

El ensayo para la validación del método de esterilización del ExLom-P (figura 2.8) permitió contar con mayor certeza de que los resultados anteriores (Figura 2.7) se deben a la presencia o ausencia de microorganismos empleados como factores predictivos en el diseño experimental (Cuadro 2.5; *vid anexos*).



**Figura 2.8.**  
Inoculación de  
agar Mueller-  
Hinton con  
ExLom-P crudo  
(no filtrado; A, B,  
C) y estéril  
(filtrado; D, E, F)  
tras siete días  
de cultivo.

Aún cuando los resultados de este ensayo son meramente cualitativos (Figura 2.8), muestran la eficacia del método de esterilización mediante filtración y corroboran la significancia de los tratamientos y las conclusiones obtenidas para esta etapa del estudio.



Las fotografías obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido (A y B; figura 2.9) muestran la germinación de las esporas de roya al ser expuestas a agua estéril. Este es el caso del tratamiento control en el cual tras 24 h se observó la elongación de tubos germinativos de *H. vastatrix* en, aproximadamente 90% de los casos. Debe recalcar que no se observan basidiosporas o teliosporas (esféricas o globulares), cuya presencia podría esperarse debido a que estas son producidas junto a las urediosporas (aunque no se ha comprobado algún rol en el ciclo de vida de la roya; Avelino y Rivas, 2013).

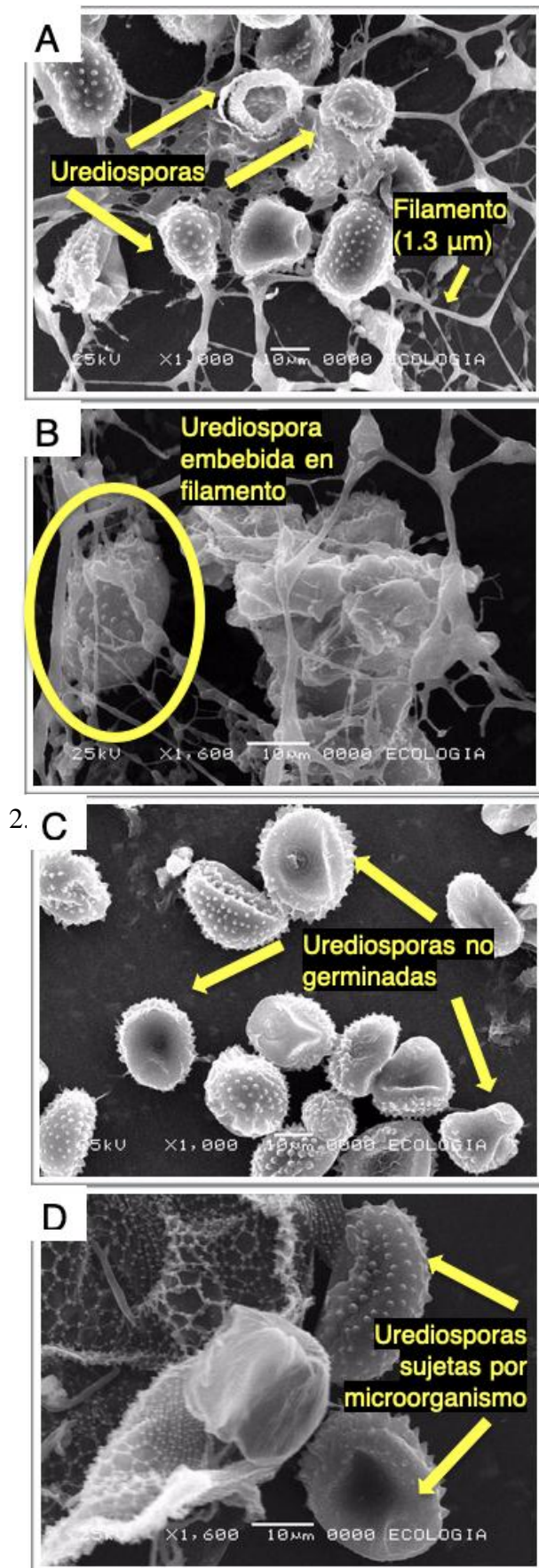
Se sigue que el experimento se llevó a cabo, primordialmente con urediosporas (esporas con una cara lisa y otra espinosa). Así, el experimento comprobó la viabilidad de las urediosporas de roya, es decir, su capacidad para desarrollar un tubo y potencialmente generar un apresorio, este es el órgano que penetra en el estoma de las hoja y que, potencialmente, infecta hojas de café.

**Figura 2.9.** Fotografía a través de microscopio electrónico de barrido. Fotografías A y C fueron realizadas con un aumento de 200x. Fotografías B y D fueron realizadas con un aumento de 1,000x. A y B muestran el desarrollo de la espora (germinación) en agua estéril desionizada (control positivo) tras 24 h de incubación en oscuridad a una temperatura de 20°C. C y D muestran el desarrollo de la espora (germinación) en extracto acuoso de lombricomposta sin nutrientes suplementarios tras 24 h de incubación en oscuridad a una temperatura de 20°C. Fotos. Tiburcio Laez Aponte, Instituto de Ecología.

También puede observarse que el tubo germinativo elongado desde la urediospora mide 4  $\mu\text{m}$  de diámetro consistente con las observaciones reportadas en Avelino y Rivas (2013).

Por su parte, las fotografías C y D (figura 9) muestran el efecto del ExLom-P crudo sin quitina (Grupo 0G; figura 7). Tanto en C como en D, puede observarse, a diferencia de A y B, el desarrollo de algún tipo de conglomerado que entre los tubos germinativos de las esporas.





De manera semejante, las fotografías obtenidas de A y B (figura 2.10) muestran la germinación de las esporas de roya al ser sumergidas en ExLom-P con un gramo de PCJ. A y B muestran filamentos ajenos a la roya que están en contacto con las urediosporas. Esto se sabe ya que el diámetro de los filamentos es más delgado que los tubos de las esporas (aproximadamente 1.3  $\mu\text{m}$ ).

Por su parte, las fotografías C y D (figura 2.10) muestran el efecto del ExLom-P crudo 3G (figura 2.7). En estas fotografías cabe destacar que no se observó el desarrollo del mismo tipo de organismos. No hay tubos o plasmodios que cubrieran a las esporas de roya, sin embargo, no existió germinación alguna (C; figura 2.10). Sí se observó otro microorganismo que interactuó con las esporas (lado izquierdo de D; figura

**Figura 2.10.** Fotografía a través de microscopio electrónico de barrido. Fotografías A y C fueron realizadas con un aumento de 1,000x. Fotografías B y D fueron realizadas con un aumento de 1,600x. A y B muestran el desarrollo de la espora (germinación) en ExLom-P con un gramo de nutriente suplementario tras 24 h de incubación en oscuridad a una temperatura de 20°C. C y D muestran el desarrollo de la espora (germinación) en ExLom-P con tres gramos de nutriente suplementario tras 24 h de incubación en oscuridad a una temperatura de 20°C. Fotos. Tiburcio Laez Aponte, Instituto de Ecología.

### 3.5.4. Etapa 4. Caracterización de ExLom-P supresor de germinación de roya

Con la evidencia documentada en las secciones anteriores se seleccionó el ExLom-P crudo sin PCJ como nutriente adicional al considerarse una alternativa eficaz y de fácil obtención, lo cual facilitaría su aplicación práctica. Como se estableció en la metodología este ExLom-P fue entonces caracterizado para conocer sus propiedades como fertilizante líquido (relacionado a la cantidad de minerales), actividad quitinasa, promotores de defensa metabólica (RSI) y compuestos fenólicos, resultados que se exponen a continuación.

#### Análisis de nutrientes minerales, pH y conductividad eléctrica

El ExLom-P es una fuente de nitrógeno (nitrato y amonio), fósforo y potasio (Cuadro 2.9), los cuales representan importantes macronutrientes requeridos para el desarrollo de cultivos y el principal interés para los productores orgánicos.

**Cuadro 2.9.** Nutrientes presentes en el extracto no aireado de lombricomposta ( $\text{mg L}^{-1}$ ). En donde (A) pulpa de café; (B) Plantas verdes, estiércol y residuos agrícolas; (C) Sustrato de hongo post-cosecha; (D) Residuos de uvas; (E) Residuos de horticultura en invernadero; (F) No reportada; (G) Estiércol de burro y residuos de plantas (bagazo de trigo y de maíz); (H) Estiércol de cerdo y bagazo de arroz; y NR significa “No reportado”.

		En este estudio	Fritz <i>et al.</i> , 2012	Marín <i>et al.</i> , 2013	Marín <i>et al.</i> , 2013	Marín <i>et al.</i> , 2013	Marín <i>et al.</i> , 2013	Mengesha <i>et al.</i> , 2017	Xu <i>et al.</i> , 2012
Materia orgánica		(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(H)
pH		5.67	8.52±0.04	8.19	8.24	8.1	8.21	7.8	8.13
CE mS/cm		436	1.52±0.1	9,180	5,340	5,760	7,030	10.3	5.76
Nutrientes totales	K	94.15	108±31	2,467	1,892	1,445	1,385	9,700	1,012
	Na	101	NR	529	215	415	611	145	NR
	Ca	11.9	NR	819	290	346	360	48.2	NR
	Mg	5.3	94±13	491	92	196	289	4.7	NR
	P	5.8	14.2 ± 5.1	17	20	20	12	NR	222.4
	Fe	0.3	NR	0.05	0.22	1.13	0.65	27.2	NR
	Mn	0	NR	1.19	0.57	0.28	0.27	13.4	NR
	Cu	0	NR	0.01	0.16	0.15	0.22	6.4	NR
	Zn	0	NR	0.81	0.17	0.36	0.23	5.3	NR
	N	6.73	NR	NR	NR	NR	NR	NR	257.3



### Actividad enzimática de quitinasa

En lo que respecta a la actividad quitinasa del ExLom-P en sus diferentes niveles de PCJ, se observó que la adición del nutriente suplementario en los niveles experimentados no aumentó la actividad de la enzima quitinasa (uno, dos o tres gramos por cada 400 gramos de pulpa de café ( $[F_{(3,6105, 19,099)} = 1.89, P > 0.1]$ ). La actividad quitinasa se mantuvo, en todos los casos, en el rango de 354 a 485 AU/ml.

### Análisis químico a través de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas de alta resolución

A través del análisis con espectrometría de masas se encontró que el ExLom-P contiene ácido abscísico y ácido jasmónico (Cuadro 2.10), ambos compuestos calificados como fitohormonas promotoras de defensa metabólica previamente reportados en suelos (Puga-Freitas y Blouin, 2014). Asimismo, se detectaron seis compuestos fenólicos, varios de los cuales presentan actividad antiséptica (Kosová *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2013; Bezerra *et al.*, 2017; Hazir *et al.*, 2017; Cuadro 2.10).

**Cuadro 2.10.** Inductores de respuesta sistémica (RSI) y compuestos fenólicos detectados en el ExLom-P identificados inequívocamente a través de UPLC en un estudio dirigido.

Compuesto	Concentración (µg/g)	Propiedades
	<b>Fitohormonas promotoras de defensa metabólica</b>	
<b>Ácido abscísico</b>	$6 \pm 2$	Maduración del embrión, la latencia de la semilla, crecimiento vegetativo y procesos relacionados con la tolerancia a estrés, tanto de tipo biótico como abiótico (Audesirk, 2017)
<b>Ácido jasmónico</b>	$1.6 \pm 0.4$	Inducen defensas en las plantas contra patógenos (Puga-Freitas <i>et al.</i> , 2012)
<b>Ácido salicílico</b>	0	Controla la inducción sistemática de resistencia contra patógenos (Puga-Freitas <i>et al.</i> , 2012).

Continúa, siguiente página

Compuesto	Concentración (µg/g)	Propiedades
	<b>Compuestos fenólicos</b>	
<b>Ácido 4-hidroxibenzoico</b>	12.24 ± 3.5	Efectos antimicrobianos y antifúngicos (Kosová <i>et al.</i> , 2015)
<b>Ácido 4-hidroxifenilacético</b>	1.78 ± 0.62	Compuesto antibiótico producido por bacterias de rizósfera en suelos que, además ha presentado efecto anti-nemátodos (Lee <i>et al.</i> , 2013)
<b>Ácido vanílico</b>	39.9 ± 6.5	Presenta actividad antioxidante (Ghareib <i>et al.</i> , 2010 y Tzun-Han <i>et al.</i> , 2010)
<b>Vanilina</b>	10.21 ± 3.04	Usado en la eliminación de patógenos de frutas y vegetales (Bezerra <i>et al.</i> , 2017) con actividad antioxidante (Tzun-Han <i>et al.</i> , 2010)
<b>Ácido p-anisico</b>	22.5 ± 5.2	No hay un uso reportado
<b>Ácido trans-cinámico</b>	0.26 ± 0.4	Metabolito microbiano (presente en <i>Photorhabdus luminescens</i> ) tóxico para diversos hongos fitopatógenos (Hazir <i>et al.</i> , 2017)

**Cuadro 2.11.** Compuestos del ExLom-P identificados tentativamente a través de UPLC en un estudio no-dirigido.

Compuesto	m/z	Polaridad	Error	Identificación tentativa	Presente en:
C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub> Cl	515.2274	Negativa	2.9	Ácido 3-O-(alfa-L-ramnopiranosilo-(1-2)-alfa-L-ramnopiranosilo)-3-hydroxydecanoico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , bacteria patógena de plantas; puede encontrarse en suelos (Abalos <i>et al.</i> , 2004)
C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>12</sub> Cl	513.1755	Negativa	3.1	Suspensólido F	Glucósido en <i>Viburnum suspensum</i> (Iwagawa <i>et al.</i> , 1990)
C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	513.1755	Negativa	-1.2	Icarisido II	Aislado de <i>Epimedium brevicornum</i> planta (China, Europa, Asia; Yin <i>et al.</i> , 2016)
C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>6</sub>	363.1801	Negativa	-1.9	Terpentecin	Aislado de una cepa de microorganismo de suelos en Japón con actividad de antibiótico (Tamamaura <i>et al.</i> , 2016)
C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O <sub>6</sub>	361.1646	Negativa	-1.4	Giberelina A36	<i>Sphaceloma rhois</i> , hongo patógeno de plantas (Bearder y Mcmillan, 1972)
C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> O <sub>9</sub>	527.228	Negativa	-0.2	Humilina A	Parte de los humilínidos identificados en la familia Meliaceae (Jimenez <i>et al.</i> , 1998)
C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub> Cl	439.1747	Negativa	3	Pisumionosido	Encontrado en semillas de <i>Pisum sativum</i> (The human metabolomeDatabase, 2018)

Es importante mencionar que la cantidad de fitohormonas y compuestos fenólicos reportados deriva de tres réplicas experimentales que se mantuvieron de forma independiente desde el momento de selección de la materia orgánica. Los resultados cuantitativos de todas las muestras fueron consistentes con la excepción del ácido trans-cinámico que sólo se encontró en una unidad experimental en baja concentración. Por su parte, a través del análisis UPLC-MS-ESI-QTOF no dirigido se identificaron tentativamente 10 compuestos (Cuadro 2.11) cuyas propiedades en el ExLom-P aún son desconocidas.

### 3.6. Discusión

#### 3.6.1. Etapa 1. Proceso de lombricompostaje

De acuerdo con la búsqueda bibliográfica realizada, este es el primer reporte en el que se aplica PCJ como nutriente suplementario en lombricompostaje. En otros trabajos, se han empleado exoesqueletos de camarón como nutriente suplementario (Poulsen *et al.*, 2008), pero esto fue llevado a cabo en un proceso de compostaje de residuos de jardín o parques y desperdicios orgánicos caseros. Este estudio también tuvo el objetivo de promover la actividad de la enzima quitinasa.

El exoesqueleto de camarón se agregó a razón de 50 g por cada tonelada de materia seca (0.005%), mientras que en nuestro estudio los niveles del factor que no disminuyeron las poblaciones de lombrices se corresponden con el 0.25%, 0.5% y 0.75%. Sin embargo, mientras que Poulsen *et al.*, (2008) obtuvieron resultados positivos (el aumento de la actividad quitinasa) esto no ocurrió en nuestro trabajo. Además de obtener resultados estadísticamente iguales, la adición de más del 0.75% de PCJ disminuyó la supervivencia de lombrices por lo que, para nuestro caso específico, la aplicación de PCJ tuvo un efecto negativo. Es probable que este efecto se deba, en parte, a la cantidad de carbonato de calcio (sal mineral) presente en el PCJ, sin embargo, esta sal es inherente a dicha fuente de quitina haciendo de este nutriente suplementario una alternativa poco óptima cuando se lleva a cabo lombricompostaje.

Otro elemento relevante es la disminución de la supervivencia de lombrices en los tratamientos testigo del primer ensayo, misma que podría interpretarse como producto de la alta densidad poblacional inoculada. Sin embargo, la cantidad de PCJ tuvo una alta significancia en la variable de respuesta pues el nivel más alto (9 gramos de PCJ) llevó a la muerte de todas las lombrices en todas sus unidades experimentales. Por el contrario, el tratamiento testigo mantuvo entre el 40% y 60% de supervivencia de sus poblaciones. Esto indica que la densidad de población, aún siendo muy alta, no es un factor suficiente para erradicar a las lombrices en las condiciones ensayadas, de ahí el efecto negativo observado de la adición PCJ independiente a la densidad poblacional. Posteriores estudios habrán de corroborar si la menor densidad poblacional previene a la comunidad de lombrices del efecto negativo corroborado en este estudio de la adición de PCJ.

#### 3.6.2. Etapa 2. Proceso para la extracción del ExLom-P

La elección del método de extracción (aireado, no aireado u otro) ha sido objeto de discusión desde que surgieron los primeros reportes sobre el empleo de extractos para el control biológico de enfermedades.

Este es el caso de Brinton *et al.*, (1996) quienes expusieron que la aireación no es necesaria para realizar un extracto de composta eficaz para el control de enfermedades en plantas. Por el contrario, Ingham (2002) consideró que la aireación de los extractos es favorable por “aumentar la riqueza de especies aerobias”. Sin embargo, si las comunidades microbianas son igualmente eficaces (es decir, si coadyuvan en el control de enfermedades sin importar si son aerobias o anaerobias), no hay argumento para airear el ExLom-P como ocurrió en este trabajo pues para ello se requiere mayor tecnología.

Como se expuso anteriormente, nuestros resultados indican que, para el caso de la aplicación de ExLom-P para disminuir la germinación de esporas de roya, no existen diferencias significativas entre el uso de un método u otro (al comparar aireado contra no aireado) pero sí del método de decocción, en el cual no se inhibió la germinación de esporas.

Estos resultados coinciden con los de Dianéz *et al.* (2006) y Xu *et al.* (2012) quienes reportaron que no hay diferencias en el uso de un método u otro para supresión de enfermedades ocasionadas por *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solania*). Así mismo, otros autores reportaron que la aplicación de extracto no aireado es más eficaz que el aireado, tal es el caso de Raoudha *et al.* (2009) y St. Martin *et al.*, (2012), quienes lograron disminuir la infección de *P. aphanidermatum* y *Pythium ultimum*, respectivamente.

Es interesante mencionar que en el trabajo de St. Martin *et al.*, (2012) los extractos mantuvieron su capacidad para disminuir el daño de *Pythium ultimum* incluso al ser esterilizados a través de autoclave. Al utilizar altas temperaturas en el procesamiento del extracto estéril, el método de St. Martin *et al.*, (2012) se puede equiparar al método de decocción utilizado en nuestro estudio, sin embargo, en nuestro caso no se encontraron resultados positivos.

Es importante mencionar que estos autores utilizaron diferentes tipos de materia orgánica (hojas de plátano y residuos de césped) y los resultados obtenidos pueden variar en función de la elección de dicha materia orgánica. Así, puede sostenerse que es necesario realizar bioensayos guiados por intereses particulares utilizando los recursos regionalmente disponibles. Para efectos de este estudio, la amplia disponibilidad de pulpa de café como materia orgánica, la sencillez del método de extracción no aireada y su eficacia en la disminución de la germinación de esporas de roya hacen que dicho método sea la elección más apropiada.

En cuanto a la metodología para evaluar la prueba de germinación, se sugiere que, para el conteo de esporas de roya y la determinación de la proporción de germinación (porcentaje), se use otro medio que

sustituya al empleo de la cámara de Neubauer. Esto debido a que la baja cantidad de esporas en las rejillas de la cámara puede dar pie al aumento de la variabilidad de resultados. En lo que respecta a nuestros ensayos, la variabilidad fue la necesaria para lograr la distinción estadística de los resultados llevándonos al no-rechazo de las hipótesis planteadas. No obstante, posteriores estudios podrían controlar dicha variabilidad al usar métodos alternativos de germinación como los propuestos por Salustiano *et al.*, (2008).

### 3.6.3. Etapa 3: Fraccionamiento del ExLom-P, el rol de los microorganismos en la germinación de esporas de roya

Como se expuso anteriormente, los efectos del control biológico de enfermedades son generalmente atribuidos a la actividad microbiológica (Dianéz *et al.*, 2006; Dianéz *et al.*, 2007; Kavroulakis *et al.*, 2010; Gurama *et al.*, 2012; Gomez-Brandon *et al.*, 2015). Con la salvedad de casos, como los reportados por St. Martin *et al.*, (2012) y Marin *et al.*, (2013), en los que, aún después de la esterilización los extractos mantuvieron efectos positivos en la disminución de enfermedades, la esterilización del extracto de composta o lombricomposta lleva generalmente a la pérdida de sus capacidades de control biológico de patógenos (Cronin *et al.*, 1996; El-Masry *et al.*, 2002; Dianéz *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012).

En este contexto, El-Masry *et al.*, (2012) realizó extractos de composta a partir de tres diferentes sustratos (residuos de hojas con frutas, hojas y plantas de cosechas) y lo probó en el control de *Phythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Sclerotium bataticola* con resultados positivos (disminución del daño), pero, al esterilizarlo con autoclave, este efecto desapareció. Sin embargo, aunque eficaz en la remoción de microorganismos, el proceso de esterilización con autoclave también descompone y/o desnaturaliza algunas moléculas termolábiles (biológicas) por lo que la comparación de ExLom-P esterilizado en autoclave con ExLom-P crudo no evalúa únicamente el factor microorganismos. Así, el presente estudio al retirar únicamente los microorganismos con microfiltros puso en evidencia que la germinación de *H. vastatrix* se debe mayoritariamente a los microorganismos. Consiguientemente, los resultados obtenidos en este estudio se suman a los reportados por otros autores (Cronin *et al.*, 1996; Dianéz *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012) en donde el proceso de microfiltración (a través de membranas con un tamaño de poro de 0.2 µm) esterilizó exitosamente el extracto y el efecto de disminución de daño de patógenos desapareció. En otras palabras, el factor más significativo para la supresión de la germinación de la roya a nivel *in vitro*, para el caso del ExLom-P son los microorganismos.

Es importante mencionar que la aplicación de extracto de composta o lombricomposta no es garantía de efectos de disminución de enfermedades en plantas. Zaller (2006) probó un extracto de lombricomposta derivado de frutas, vegetales y desperdicio de algodón contra *Phytophthora infestans* (un género que Dianéz *et al.*, 2006 y Kravroulakis *et al.*, 2010 reportaron que controlaron con extracto de composta) y concluyó que el extracto no tenía efectos significativos en el control de dicha enfermedad. Por ende, los resultados positivos obtenidos a través de este estudio pueden no ser aplicables a otras enfermedades foliares.

#### 3.6.4. Etapa 4. Caracterización de ExLom-P supresor de germinación de roya

Generalmente se da por hecho que un extracto de composta o lombricomposta contiene nutrientes minerales que pueden ser aprovechados por las plantas (Arancon *et al.*, 2007; Zaller, 2006). El ExLom-P contiene macronutrientes que se encuentran también disponibles para las plantas (solubilizados). Las características del extracto reportado por Fritz *et al.*, (2012) producido a partir de “plantas verdes, estiércol y residuos agrícolas” son las que más se asemejan a las del extracto obtenido a través de nuestro método. El extracto obtenido por estos autores incrementó el crecimiento de trigo, rábano, *Rucola selvatica* y *Pisum sativum* en condiciones de invernadero por lo que, potencialmente, el ExLom-P producido a través de nuestro método podría coadyuvar en la nutrición de las citadas especies de producción hortícola.

Cabe destacar que el aporte de nutrientes minerales no es el objetivo principal del ExLom-P que se ha obtenido a través de nuestro método. De hecho, Rodríguez (2017) comparó la riqueza mineral de ExLom-P contra el lixiviado producido durante el lombricompostaje de pulpa de café. Sus resultados indican que el lixiviado contiene una mayor cantidad de nutrientes solubilizados pudiendo ser calificado como una mejor opción en lo que refiere a extracción de minerales. También, al comparar la cantidad de minerales contra otros extractos acuosos de composta (Cuadro 2.9), el ExLom-P tiende a presentar menores concentraciones de potasio, sodio, calcio, magnesio, fósforo, manganeso, cobre y zinc.

Debe destacarse que la aportación de minerales, en lo que respecta al ExLom-P, es un beneficio extra que el extracto puede ofrecer al cultivo de café paralelamente a la inhibición de la germinación de esporas de roya. Con miras a optimizar la extracción de macro y/o micronutrientes se requieren de esfuerzos semejantes a los aquí realizados (estandarización de un método) teniendo como prioridad la concentración de minerales como variable de respuesta.

En este contexto, un parámetro usado comúnmente para medir la disponibilidad de minerales y nutrientes es la conductividad eléctrica (CE) tal como lo realizaron Xu *et al.*, (2012), Marin *et al.*, (2013) y Mengesha *et al.*, (2017). La conductividad del ExLom-P se encuentra en un nivel medio, al compararse con lo reportado por Fritz *et al.*, (2012) y Marin *et al.*, (2013) fortaleciendo la hipótesis del potencial uso de este ExLom-P como solución nutritiva de especies de plantas de interés.

### 3.6.5. Actividad quitinasa

La actividad quitinasa, aunque considerada importante en el control de enfermedades (Schlumbaum *et al.*, 1986), pocas veces ha sido pocas veces cuantificada en extractos de composta o lombricomposta. En diferentes sustratos bajo compostaje (p.e. pulpa de café, restos de hoja-frutas, residuos de jardín, residuos de cosechas) el rango de actividad quitinasa se mantiene entre 250 y 563 unidades por mililitro (El-Masry *et al.*, 2002; Cuadro 2.12) rango en el que también se ubicaron los resultados de actividad quitinasa de todos los extractos obtenidos.

**Cuadro 2.12.** Comparación de la actividad de la enzima quitinasa obtenida en el presente trabajo (con y sin adición de PCJ), con la del estudio de El-Masry *et al.*, (2002).

Materia orgánica	Método de descomposición	Nutriente suplementario	Actividad enzimática (AU/ml)	Cita
Pulpa de café	Lombricompostaje	Ninguno	427.09±43.45	Este trabajo
Pulpa de café	Lombricompostaje	1 g de CJ	485.06±34.91	Este trabajo
Pulpa de café	Lombricompostaje	2 g de CJ	367.59±62	Este trabajo
Pulpa de café	Lombricompostaje	3 g de CJ	354.18±26.21	Este trabajo
Restos de fruta y hojas	Compostaje	Ninguno	527±3	El-Masry <i>et al.</i> , (2002)
Residuos de jardín	Compostaje	Ninguno	250±5	El-Masry <i>et al.</i> , (2002)
Residuos de cosecha	Compostaje	Ninguno	563±1	El-Masry <i>et al.</i> , (2002)



El hecho de que la actividad quitinasa más alta se corresponda con el extracto derivado de composta de residuos de cosecha sin requerir el uso de nutrientes suplementarios ricos en quitina hace la propuesta del uso de PCJ como nutriente suplementario sea ilógica pues, debe recordarse, estadísticamente los tratamientos fueron iguales. En nuestro estudio, la adición de PCJ no sólo fue incapaz de incrementar la actividad de quitinasa en el ExLom-P sino que también se observó una ligera tendencia a disminuir la actividad de esta enzima conforme se aumentó la cantidad de PCJ en la lombricomposta (Cuadro 2.12).

Por otro lado, Jayakumar y Natarajan (2013) aislaron y estudiaron 193 cepas bacterianas a partir de una lombricomposta derivada de bagazo y estiércol de cabra, de las cuales ninguna dio un resultado positivo (cualitativo) de quitinasa. Resultados diferentes fueron reportados por Yasir *et al.*, (2009) quienes investigaron la diversidad de genes de quitinasa en un extracto de lombricomposta que disminuye la germinación de *Fusarium moniliforme*, concluyeron que las poblaciones microbianas que inhibieron el crecimiento del patógeno tuvieron concentraciones de quitinasa más altas que el resto de cepas.

De hecho, Mee y Ki (2011) demostraron que al aplicar ExLom-P a plantas de pepino pimienta, producían sus propias enzimas quitinasa dentro de sus hojas. Es decir, el extracto podría, además de aportar enzimas quitinasa extracelulares, indujo defensas metabólicas; un efecto que también podría atribuirse a los microorganismos (Puga-Freitas y Blouin, 2014).

Así, la evidencia indica que las enzimas quitinasa están inmersas en el extracto de composta (El-Masry *et al.*, 2002) o lombricomposta (Yasir *et al.*, 2009) y que estas se encuentran en el rango de 200 a 600 AU ml<sup>-1</sup> independientemente de los niveles utilizados de PCJ, mismos que no tuvieron efecto como inductores de actividad quitinasa.

Cabe recordar que el aumento de esta cantidad de PCJ también mostró efectos negativos en lo que respecta al proceso de lombricompostaje. En otras palabras, los niveles de PCJ experimentados:

- a) no tienen efecto en el aumento o disminución de la actividad quitinasa del extracto de lombricomposta;
- b) tampoco tuvieron efectos en la disminución de la germinación de esporas de roya en donde los resultados fueron mayormente atribuibles a la actividad de microorganismos y, además,
- c) disminuyó la supervivencia de lombrices en el cultivo.

Por consiguiente, la adición de este nutriente (en los niveles experimentados) no es recomendable para la producción de lombricomposta o para producción de ExLom-P.

### 3.6.7. Análisis químico a través de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas de alta resolución

Estos son los primeros hallazgos de la presencia o identificación de fitohormonas y compuestos fenólicos en ExLom-Ps. Tanto el ácido abscísico como el ácido jasmónico, como promotores de defensa metabólica son moléculas señal, fitohormonas, cuyos efectos de protección contra la roya podrían ser comprobados únicamente al realizar pruebas *in vivo*, esto es al aplicarse directamente en plantas.

En este contexto, al contener promotores de defensa metabólica, el ExLom-P estéril podría en primera instancia, disminuir la germinación de esporas del hongo y, adicionalmente disminuir el daño foliar causado por *H. vastatrix* al inducir una respuesta sistémica de defensa contra patógenos como lo sugieren Puga-Freitas y Blouin (2014). Posteriores estudios habrán de comprobar dicha hipótesis al contrastar los efectos de la aplicación de estos extractos contra un grupo control que conste de aplicación de ácido jasmónico, ácido abscísico o su combinación. El ácido abscísico ha sido utilizado exitosamente en una concentración de  $1\mu\text{g ml}^{-1}$  para promover el flujo de fluidos en el xilema (Glinka, 1980) y, por el contrario, una concentración mayor,  $6\mu\text{g ml}^{-1}$ , se relaciona con efecto fitotóxico al impedir la germinación del arroz (Stinissen *et al.*, 1984). La concentración detectada en este estudio fue de  $6 \pm 2\mu\text{g g}^{-1}$ , por ende, este ExLom-P podría diluirse para ser aplicado y promover el efecto observado por Glinka (1980) para lo cual se requieren de pruebas con semillas de acuerdo a intereses particulares.

De los seis compuestos fenólicos, el ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxifenilacético y el ácido p-anísico han presentado actividad antifúngica (Lee *et al.*, 2013 y Kosová *et al.*, 2015) que podría haberse relacionado con una disminución de la germinación de las esporas de roya. Sin embargo, al remover los microorganismos del ExLom-P en los experimentos previamente discutidos, el efecto de disminución de la germinación de esporas de roya disminuyó al mismo nivel que el control positivo. Esta evidencia experimental invalida el potencial de dichos compuestos como antifúngicos en lo que respecta al desarrollo de las esporas de *H. vastatrix* pero mantiene abierta la posibilidad de su potencial efecto para coadyuvar en la disminución del daño causado por otras enfermedades bacterianas o fúngicas.

Entre los compuestos identificados tentativamente a través del análisis fitoquímicos no-dirigido se destaca la presencia tentativa de la Giberelina A36. Estas fitohormonas estimulan la germinación de las semillas, desarrollo de frutos, así como la división y alargamiento de células (Audesirk, 2017). De

comprobarse inequívocamente, la presencia de esta fitohormona podría explicar el efecto de la aplicación de extractos de los cuales se ha probado que promueven la germinación de semillas de *Pinus pinaster* (Lazcano *et al.*, 2010) y mejoran la calidad de frutos aumentando su tamaño (Zaller, 2006; Arancon *et al.*, 2007; St. Martin *et al.*, 2012). Dicha identificación inequívoca podría realizarse al contrastar los resultados de un cromatograma de Giberelina A36 pura con un cromatograma del ExLom-P en donde ambos picos de absorbancia deben coincidir en el tiempo de retención, masa atómica y patrones de fragmentación.

En suma, las fitohormonas identificadas, compuestos fenólicos y la gran cantidad de compuestos identificados en el estudio no-dirigido, ubican al ExLom-P como una mezcla con propiedades de interés para el campo de la producción orgánica. Por lo anterior, continuar con estudios de fraccionamiento y análisis biodirigidos podría coadyuvar a dar valor agregado a este subproducto.

### **3.7. Conclusiones**

El proceso de lombricompostaje de pulpa de café con baja cantidad de quitina (0.75%) no promueve la muerte de las lombrices. Sin embargo, la adición de este nutriente complementario no es relevante en la producción de ExLom-P para el aumento de la actividad específica de enzima quitinasa ya que los niveles probados de quitina no tuvieron un efecto para aumentar o disminuir la actividad de quitinasa pero sí es notoria una ligera tendencia a la disminución de la actividad al aumentar los niveles de PCJ. La adición de PCJ tampoco tuvo significancia para disminuir la germinación de esporas de roya, en este punto, el factor más importante fueron los microorganismos ya que, al retirarlos por medio de filtración, el ExLom-P perdió su capacidad de supresión de germinación de esporas. Esto muestra su potencial uso para combatir la roya del café. De esta manera se tiene que, entre las alternativas ensayadas, el mejor ExLom-P es aquél producido a partir de lombricomposta de pulpa de café obtenida tras 42 días de cultivo en una temperatura aproximada de 20°C, tras lo cual debe realizarse una extracción por maceración sin aireación y aplicarse en crudo (sin filtración o esterilización).

Por su parte, el ExLom-P crudo se sitúa entre los extractos con menor cantidad de nutrientes minerales (K, Na, Ca, Mg, P, Mn, Cu y Zn) pero contiene otros compuestos bioquímicos de interés entre las que se destaca el ácido abscísico y el ácido jasmónico como promotores de defensa metabólica, además de la probable presencia de una giberelina, promotora de crecimiento de frutos y germinación. Estas fitohormonas podrían ser las responsables de diversos efectos observados en reportes científicos como el aumento de calidad de frutos y el aumento de germinación de semillas.

### 3.8. Agradecimientos

Los autores agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado y al Inecol por el apoyo instrumental e institucional así como por la alta calidad de sus cursos que le caracterizan. Así mismo a los investigadores cuya experiencia guió el presente trabajo a sus resultados expuestos.

Agradecemos también el trabajo técnico y entusiasmo de la bióloga Marycruz Álvarez J. quien con sus ideas y fotografías mejoró de forma importante el contenido de este trabajo. En la misma medida agradecemos al doctor Juan Luis Monribot y el técnico Ángel Sahid por su apoyo en los análisis fitoquímicos del ExLom-P adscritos al área de química de productos naturales en el Clúster Científico y Tecnológico Biomimic<sup>®</sup> del Instituto de Ecología A. C. Así como de la doctora Ofelia Ferrera Rodríguez por el acceso al equipo de microbiología y a Alma Rodríguez, estudiante de la especialización en Métodos Estadísticos de la Universidad Veracruzana quien realizó los análisis de minerales en conjunto con la Mtra. Sandra Rocha del Laboratorio de Análisis Químicos de Suelo, Agua y Planta (LAQSAP) y al Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana por su apoyo institucional.

No omito agradecer el apoyo de el técnico Tiburcio Laez Aponte cuya expertitud en el manejo del Microscopio Electrónico de Barrido que nos permitió observar a detalle las esporas de roya y su interacción con el ExLom-P.

### 3.9. Referencias

- Abalos A, Vinas M, Sabate J, Manresa MA, Solanas AM (2004) Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT 10. *Biodegradation* 15(4):249 – 260
- Aceves-Aparicio A, Tapia-McClung H, Macías-Ordoñez R, Rao D (2018) Subsocial spiders in space and time: A fine scale approach to the dynamics of dispersal. *Ethology* 124(7):1 - 10
- Allan JE (1971) The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectroscopy. Editorial Varian techtron. Estados Unidos de América.
- Arancon, N. Q.; Edwards, C. E.; Dick, R.; Dick, L. 2007. Vermicompost tea production and plant growth impacts. Biocycle. November. 2p.

- Aranda E, Barois I, Arellano P, Irisson S, Salazar S, Rodríguez T, Patrón JC (1999) Vermicomposting in the tropics. Capítulo en: Earthworm management in tropical agroecosystems. Lavelle P, Hendrix P, Brussard L (Eds.). Editorial CAB International London.
- Aranda E, Barois I (2000) Coffee pulp vermicomposting treatment. Capítulo en: Sera Y, Soccol CR, Pandey A, Roussos S (eds) Coffee Biotechnology and Quality. Editorial Springer. Brasil.
- Audesirk T (2017) Biology. Life on earth with physiology. 9ª edición. Pearson Education.
- Avelino J, Zelaya H, Merlo A, Pineda A, Ordoñez M, Savery S (2006) The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. *Ecological Modelling* 197(3-4):431 - 447
- Avelino J, Rivas G (2013) La roya anaranjada del cafeto. <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>, 47.
- Bearder JR, McMillan J (1972) Gibberellin A36, isolation from *Gibberella fujikuroi*, structure and conversion to Gibberellin A37. *Agronomic and Biological Chemistry* 36(2):342 - 344
- Bezerra CF, Camilo CJ, Silva MKN, de Freitas TS, Ribeiro-Filho J, Coutinho HDM (2017) Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria. *Microbial pathogenesis* 113:265 – 268
- Boulter JI, Boland GJ, Trevors JT (2002) Assessment of compost for suppression of Fusarium patch (*Microdochium nivale*) and Typhula Blight (*Typhula ishikariensis*) snow molds of turfgrass. *Biological control*. 25(2):162-172.
- Brinton WF, Tränkner A, Droffner M (1996) Investigations into liquid compost extracts. *Biocycle* 37(11):69 - 70
- Capistrán F, Aranda E, Romero JC (2001) Manual de reciclaje, compostaje y lombricompostaje. 1ª edición. Editorial Instituto de Ecología, A. C. Mexico.
- Chukwujindu MAI, Egun AC, Emuh FN, Isirimah NO (2006) Compost maturity evaluation and its significance to agriculture. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(15):2933 – 2944
- Conover WJ, Iman RL (1981) Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician* 35(3):124 - 129
- Cronin MJ, Yohalem DS, Harris RF, Andrews JH (1996) Putative mechanism and dynamics of inhibition of the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* by compost extracts. *Soil biology and biochemistry* 28(9):1241 - 1249

- Dianéz F, Santos M, Boix A, de Cara M, Trillas I, Avilés M, Tello JC (2006) Grape marc compost tea suppressiveness to plant pathogenic fungi: Role of siderophores. *Compost science and utilization* 14(1):48 - 53
- Dianéz F, Santos M, Tello JC (2007) Suppressive effects of grape marc compost on phytopathogenic oomycetes. *Archives of phytopathology and plant protection* 40(1):1 – 18
- Dordas C (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development*. 28(1):33-46.
- El-Masry MH, Khalil AI, Hassouna MS, Ibrahim HAH (2002) *In situ* and *in vitro* suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World journal of microbiology and biotechnology* 18(6):551 - 558
- Fritz JI, Franke-Whittle IH, Haindl S, Insam H, Braun R (2012) Microbiological community analysis of vermicompost tea and its influence on the growth of vegetables and cereals. *Canadian journal of microbiology* 58(7):836 - 847
- Ghareib HRA, Abdelhamed MS, Ibrahim OH (2010) Antioxidative effects of the acetone fraction and vanillic acid from *Chenopodium murale* on tomato plants. *Weed Biology and Management* 10(1):64 - 72
- Glinka Z (1980) Absciscic acid promotes both volumen flow and ion release to the xylem in sunflower roots. *Plant Physiology* 65(3):537 - 540
- Gomez-Brandon M, Vela M, Martínez-Toledo MV, Insam H, Domínguez J (2015) Effects of compost and vermicompost teas as organic fertilisers. Capítulo en: Sinha S, Pant KK, Bajpai S. *Advances in Fertiliser Technology: Synthesis* (Vol. 1). Editorial Studium Press.
- Gurama AU, Haruna SG, Adebitan SA (2012) Characteristics and anti fungal effect of composts on *Fusarium oxysporum* F. SP. *lycopersici* incitant of *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of biodiversity and environmental sciences* 2(7):23 - 31
- Hazir S, Shapiro-Ilan DI, Bock CH, Leite LG (2017) Trans-cinnamic acid and *Xenorhabdus szentirmaii* metabolites synergize the potency of some comercial fungicides *Journal of Invertebrate Pathology* 145:1 - 8

- Hein L, Gatzweiler F (2006) The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. *Ecological Economics* 60(1):176 - 185
- Ingham ER (2002) The compost tea brewing manual. Soil Foodweb Inc. Estados Unidos de América.
- Iwagawa T, Yaguchi S, Hase T (1990) Iridoid glucosides from *Viburnum suspensum*. *Phytochemistry* 29(1):310 - 312
- Jackson D, Skillman J, Vandermeer J (2012) Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control* 61(1):89 - 97
- Jayakumar P, Natarajan S (2013) Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. *Applied soil ecology* 70:33 - 47
- Jimenez A, Villerreal C, Toscanob RA, Cookc M, Arnasonc JT, Byed R, Mataa R (1998) Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae) taken in part from the PhD and MS theses of C. Villarreal and M. A. Jiménez, respectively. *Phytochemistry* 49(7):1981 - 1988
- Kavroulakis N, Ntougias S, Besi MI, Katsou P, Damaskinou A, Ehaliotis C, Zervakis GI, Papadopoulou KK (2010) Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant soil* 333(1-2):233 - 247
- Kosová M, Hrádková I, Mátllová V, Kadlec D, Smidrkal J, Filip V (2015) Antimicrobial effect of 4-hydroxybenzoic acid ester with glycerol. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 40(4):436 - 440
- Lazcano C, Sampedro L, Zas R, Domínguez J (2010) Vermicompost enhances germination of the maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *New Forests* 39(3):387 - 400
- Lee YS, Anees M, Hyun HN, Kim KY (2013) Biocontrol potential of *Lysobacter antibioticus* HS124 against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, causing disease in tomato. *Nematology* 15(5):545 - 555
- Lewis WH, Lamas G, Vaisberg A, Corley DG, Sarasara C (1999) Peruvian medicinal plant sources of new pharmaceuticals (International cooperative biodiversity group-Peru). *Pharmaceutical Biology* 37(4):69 - 83

- Manson RH, Hernández-Ortíz V, Gallina S, Mehltreter K (eds) (2008) Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz. Biodiversidad, manejo y conservación. 1ª edición. Editorial Instituto de Ecología A. C. e Instituto Nacional de Ecología. México.
- Marin F, Dianéz F, Santos M, Carretero F, Gea FJ, Castañeda C, Navarro MJ, Yau JA (2014) Control of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica* on pepper (*Capsicum annuum* L.) with compost teas from different sources, and their effects on plant growth promotion. *Phytopathologia Mediterranea* 53(2):216 - 228
- Mee KS, Ki DK (2011) Biocontrol activity and primed systemic resistance by compost water extracts against anthracnoses of paper and cucumber. *Phytopathology* 101(6):732 - 740
- Mengesha WK, Powdell SM, Evans KJ, Barry KM (2017) Diverse microbial communities in non aerated teas suppress bacterial wilt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33(3):33 - 49
- Pane C, Celano G, Villico D, Zaccardelli M (2012) Control of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Pyrenochaeta lycopersici* on tomato with whey compost-tea applications. *Crop protection* 38:80 - 86
- Pleissner D, Anna-Katrin N, Mehlmann K, Schneider R, Puerta-Quintero GI, Venus J (2016) Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. *Bioresource technology* 218:167 - 173
- Poulsen PHB, Moller J, Magid J (2008) Determination of a relationship between chitin's activity and microbial diversity in chitin amended compost. *Bioresource technology* 99(10):4355 - 4359
- Puga-Freitas R, Blouin M (2014) A review of the effects of soil organisms on plant hormone signaling pathways. *Environmental and experimental botany* 114:104 - 116
- Puga-Freitas R, Barot S, Taconnat L, Renou JP, Blouin M (2012) Signal molecules mediate the impact of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on growth, Development and defence of the plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7(12):10
- Raoudha KBJ, Rabiaa H, Mohamed AT, Jean-Jaques G, Khaled H, Mohamed BK, Belgacem H (2009) Compost, compost extracts and bacterial suppressive action on *Pythium aphanidermatum* in tomato. *Pakistan Journal of Botany* 41(1):315 - 327



- Roberts WK, Selitrennikoff CP (1988) Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Journal of General Microbiology* 134:169 - 176
- Rodríguez MAD (2017) Comparación de las cantidades de macronutrientes a través del análisis métodos no paramétricos en fertilizante líquido de lombricomposta de pulpa de café obtenido de tres formas. Tesis. Especialización en Métodos Estadísticos. Universidad Veracruzana. México.
- Salustiano ME, Pozza EA, Ferraz FAC, Botelho AO, Alves E (2008) Variabilidade em dez populações de *Hemileia vastatrix* em relação à germinação e ao comprimento do tubo germinativo em quatro temperaturas. *Ciência e Agrotecnologia* 32(5):1651 - 1656
- Sania MBA, Rasiah L, Brismak GR, Débora DB, Alcione OG (2012) The use of exoskeletons of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Crab (*Ucides cordatus*) for the extraction of chitosan and production of nanomembrane. *Materials sciences and applications* 3(7):495 – 508
- Scheuerell SJ, Mahaffee WF (2004) Compost tea as a container medium drench for suppressing seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 94(11):1156 - 1163
- Scheuerell S, Mahaffee W (2002) Compost tea: Principles and prospects for plant disease control. *Compost science and utilization* 10(4):313 - 338
- Schlumbaum A, Mauch F, Vögeli U, Boller T (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324(6095):365 - 367
- St. Martin C, Dorinvil W, Brathwaite R, Ramsubhag A (2012) Effects and relationship of compost type, aeration and brewing time on compost tea properties, efficacy against *Pythium ultimum*, phytotoxicity and potential as a nutrient amendment for seedling production. *Biological Agriculture and Horticulture* 28(3):23
- Stinissen HM, Peumans WJ, De Langhe E (1984) Abscissic acid promotes lectin biosynthesis in developing and germinating rice embryos. *Plant cell reports* 3(2):55 - 59
- Tamamaura T, Sawa T, Isshiki K, Masuda T, Homma Y, Iinuma H, Naganawa H, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H (1985) Isolation and characterization of terpentecin a new antitumor antibiotic. *The Journal of Antibiotics* 38(12):1664 – 1669

- Tzun-Han C, Hsiou-Yu D, Wei JH, Chia-Hua L (2010) Antioxidative characteristics and inhibition of alpha-melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*. *Experimental dermatology* 19(8):742 - 750
- Xu D, Raza W, Yu G, Zhao Q, Shen Q, Huang Q (2012) Phytotoxicity analysis of extracts from compost and their ability to inhibit soil-borne pathogenic fungi and reduce root-knot nematodes. *World journal of microbiology and biotechnology* 28(3):1193 - 1201
- Yasir M, Aslam Z, Kim SW, Lee SW, Jeon CO, Chung YR (2009) Bacterial community composition and chitin's gene diversity of vermicompost with anti fungal activity. *Bioresource technology* 100(19):4396 - 4403
- Yin C, Deng Y, Gao J, Li X, Liu Y, Gong Q (2016) Icariside II, a novel phosphodiesterase-5 inhibitor, attenuates streptozotocin-induced cognitive deficits in rats. *Neuroscience* 328(22):69 - 79
- Zaller J (2006) Foliar spraying of vermicompost extracts: Effects on fruit quality and indications of lateblight suppression of field-grown tomatoes. *Biological agriculture and horticulture* 24(2):165 - 180

## Anexos del capítulo 2

**Cuadro 2.1.** Diseño experimental del primer cultivo de lombrices para producción de lombricomposta.

Experimento “Cultivo de lombrices en pulpa con diferentes niveles de CJ”			
<b>Diseño</b>	Completamente al azar	<b>No. de réplicas por tratamiento</b>	5
<b>Factores</b>	Fuente de quitina (CJ)	<b>No. de unidades experimentales</b>	20
<b>Niveles de factor</b>	0, 3, 6 y 9 gramos	<b>Variables de respuesta</b>	Índice de supervivencia de lombrices
<b>Tratamientos</b>	4		

**Cuadro 2.2.** Diseño experimental de segundo cultivo de lombrices para producción de lombricomposta.

Experimento “Cultivo de lombrices en pulpa con diferentes niveles de CJ”			
<b>Diseño</b>	Completamente al azar	<b>No. de réplicas por tratamiento</b>	5
<b>Factores</b>	Fuente de quitina (PCJ)	<b>No. de unidades experimentales</b>	20
<b>Niveles de factor</b>	0, 1, 2 y 3 gramos	<b>Variables de respuesta</b>	Índice de supervivencia de lombrices
<b>Tratamientos</b>	4		

**Cuadro 2.3.** Diseño experimental de experimento de selección del método óptimo de extracción para disminuir la germinación de las esporas de roya del café.

Experimento “efecto del método de extracción en la germinación de roya del café”			
<b>Diseño</b>	Completamente al azar	<b>No. de réplicas por tratamiento</b>	6
<b>Factores</b>	Método de extracción	<b>No. de unidades experimentales</b>	24
<b>Niveles de factor</b>	Aireación, no aireación y decocción	<b>Variables de respuesta</b>	Porcentaje de germinación de esporas de roya
<b>Tratamientos</b>	4 (tres experimentales y un control positivo)		

**Cuadro 2.4.** Diseño experimental que garantiza la esterilidad a través del método de filtración.

Experimento/Prueba de esterilidad			
<b>Diseño</b>	Completamente al azar	<b>No. de réplicas por tratamiento</b>	3
<b>Factores</b>	Esterilización	<b>No. de unidades experimentales</b>	6
<b>Niveles de factor</b>	Extracto filtrado, extracto no filtrado.	<b>Variables de respuesta</b>	Desarrollo de microorganismos (cualitativo)
<b>Tratamientos</b>	2		

**Cuadro 2.5.** Diseño experimental de la evaluación del efecto de la fracción microbiológica en la disminución de la germinación de esporas de roya del café.

Experimento “efecto de microorganismos en la disminución de la germinación de la roya”			
<b>Diseño</b>	Completamente al azar	<b>No. de réplicas por tratamiento</b>	5
<b>Factores</b>	Presencia de microorganismos, cantidad de PCJ en lombricomposta	<b>No. de unidades experimentales</b>	45
<b>Niveles de factor</b>	Presencia y ausencia de microorganismos / Cero, uno, dos y tres gramos; respectivamente	<b>Variables de respuesta</b>	Porcentaje de germinación de esporas de roya
<b>Tratamientos</b>	9		



## 4. Capítulo 3. Disminución del daño foliar ocasionado por roya del café (*Hemileia vastatrix*) a través de la aplicación de extracto acuoso de lombricomposta

**Autores:** Hernández-Hernández Eduardo, Barois Isabelle, Alarcón-Gutiérrez Enrique, Guerrero-Analco José Antonio y Avelino Jacques.

### 4.1. Resumen

Debido a que las alternativas más eficaces para el control de la roya del café tienen impactos ecológicos y económicos negativos, se requieren de alternativas de control biológico que coadyuven a la disminución de dichos impactos y que, además, sean eficaces en la disminución del daño foliar causado por *H. vastatrix* en los cafetales. Considerando que el extracto acuoso de lombricomposta de pulpa de café (ExLom-P) disminuye la germinación de esporas de roya *in vitro*, se planteó que este extracto también podría coadyuvar en la mitigación del daño foliar causado por dicho hongo. Por lo tanto, el presente estudio se centró en la evaluación del efecto de la aplicación foliar del ExLom-P en el daño ocasionado por la roya. Para ello se realizaron dos experimentos en invernadero donde se inocularon manualmente plantas de café con esporas de roya y se les aplicaron ExLom-Ps crudos y estériles; así como ExLom-Ps derivados de lombricompostas enriquecidas con polvo de caparazón de jaiba (PCJ). La aplicación del ExLom-P se efectuó 2 horas antes de la deposición de esporas, al mismo tiempo, dos y cinco horas después de la deposición de esporas de roya. Tomando como variable de respuesta el área de daño foliar, en todos los casos se observó que el ExLom-P disminuye el daño foliar ocasionado por la roya en plantas de café al compararse contra el control positivo. Por su parte, los diferentes niveles de adición de PCJ y la esterilización del extracto no mostraron tener efectos significativos en la disminución o aumento del daño foliar. Por lo tanto, se concluyó que el ExLom-P es efectivo en la disminución del daño foliar de la roya independientemente si se esteriliza o se enriquece con los niveles experimentados con PCJ.

**Palabras clave.** Lombricomposta, té de lombricomposta, supresión de enfermedades foliares, daño foliar, roya del café.

### 4.2. Introducción

Los cafetales de sombra son uno de los agroecosistemas de mayor valor económico y ecosistémico en México (Food and Agriculture Organization [FAO], 2015). Desafortunadamente, bajo las condiciones ambientales que se generan por la sombra o malas prácticas de manejo, el hongo *Hemileia vastatrix* prolifera e infecta las hojas de los cafetos, disminuyendo la productividad del cultivo y ejerciendo así

una presión negativa en términos ecológicos y económicos a nivel mundial (Avelino *et al.*, 2006; Manson *et al.*, 2008). El aumento de costos por pérdida de cosecha y los esfuerzos de mitigación se estima entre el 6 y 13% de la producción mundial de café, lo cual monetariamente se traduce en alrededor de mil millones de dólares (Hein y Gatzweiler, 2006).

Ya que en un estudio previo (Hernández-Hernández *et al.*, capítulo 2) se demostró que el extracto de lombricomposta de pulpa de café (ExLom-P) disminuye la germinación de las esporas del hongo *H. vastatrix*, es factible suponer que la aplicación de ExLom-P podría coadyuvar a la disminución del daño foliar que este patógeno causa en los cultivos de *Coffea arabica* var. Típica. No obstante, esta hipótesis sólo es apoyada por reportes de usos empíricos sin bases científicas. Por consiguiente, es necesario realizar pruebas apegadas a un diseño experimental que permita generar conclusiones objetivas replicables.

De forma general, el éxito de los extractos de diferentes tipos de composta (Dianéz *et al.*, 2006; Dianéz *et al.*, 2007; Kavroulakis *et al.*, 2010; Gurama *et al.*, 2012) y de lombricomposta (Gomez-Brandon *et al.*, 2015) en el control biológico de enfermedades de plantas ha sido atribuido a la actividad antagónica de la microbiota y a la actividad de la enzima quitinasa (Poulsen *et al.*, 2008). En consecuencia, este estudio se centró en determinar: **i)** si la aplicación foliar del ExLom-P disminuye el daño foliar ocasionado por *Hemileia vastatrix* en plantas de



**Figura 3.1.** Hojas de café infectadas por *H. vastatrix*. Ubicación Emiliano Zapata, localidad El Palmar. Foto: Eduardo Hernández H.

café; **ii)** el efecto de la adición de un nutriente suplementario (polvo de caparazón de jaiba o PCJ) en la lombricomposta, como inductor de quitinasas, bajo el supuesto de que una mayor cantidad de quitina en lombricompostaje disminuiría en mayor medida el daño foliar; **iii)** la relevancia de los microorganismos del ExLom-P en la disminución del daño foliar; y **iv)** el efecto del momento de aplicación del ExLom-P en la hoja.



### **4.3. Materiales y métodos**

El ExLom-P fue producido de acuerdo a las condiciones detalladas por Hernández-Hernández *et al.*, (capítulo 2 apartado 3.3.2, método de extracción sin aireación).

#### **4.3.1. Recolección de esporas y obtención de esporas raza tipo II**

Primer experimento. Valoración del daño foliar por *H. vastatrix*. Roya in vivo.

El 3 de abril de 2016 se realizó la colecta de esporas de roya del café en el municipio de Emiliano Zapata, localidad El Palmar La Estación. Para ello se cortaron hojas con esporas que se depositaron en bolsas resellables “ziploc” y fueron transportadas al laboratorio de suelos del Instituto de Ecología A. C., en donde se removi6 la espora utilizando pinceles. La esporada fue depositada en un frasco estéril de 5 ml, el cual fue tapado y almacenado a 4°C, hasta el momento de su empleo.

Con el objeto de obtener roya de café de raza tipo II, de gran virulencia, las esporas se inocularon en 35 plantas juveniles de aproximadamente 50 cm de altura de *Coffea arabica* var. *Typica* en 6 abril de 2016. Para ello, las esporas fueron suspendidas en 20 ml de agua e impregnadas en las hojas de café. Después de dos meses, se colectaron las esporas producidas por las plantas infectadas y volvieron a ser inoculadas en plantas sanas, cuyas esporas producidas se colectaron en 18 agosto de 2016, mismas que fueron utilizadas para el primer experimento de daño foliar.

*Segundo experimento.* Las esporas empleadas para este experimento de daño foliar fueron colectadas directamente del campo, esto debido a que se esperaba producir suficiente cantidad de espora a partir del primer experimento. Sin embargo, por la efectividad de los tratamientos, la producción de esporas fue insuficiente. Por lo tanto, la colecta de esporas se llevó a cabo en junio de 2017 en la localidad de San Marcos, Veracruz. Para ello, se siguió el mismo método de recolección usado en abril de 2016.

#### **4.3.2. Producción de lombricomposta**

Se produjo lombricomposta según los lineamientos de Capistrán *et al.*, (2001) con la única modificación del uso de menor densidad de población para lo cual se utilizaron botes de plástico (con forma cúbica) con 12 cm de arista en donde se agregaron 400 g de pulpa de café (10 cm de altura en el bote) y 50 lombrices por unidad experimental.

La pulpa de café fue obtenida de un beneficio húmedo en el municipio de Xico, Ver. Esta fue trasladada al Instituto de Ecología el día 28 de mayo de 2016, donde se procedió a su esterilización a 121°C por 15 minutos. La humedad fue ajustada a un nivel óptimo 70% (Capistrán *et al.*, 2001).

El nutriente suplementario o polvo de caparazón de jaiba (PCJ) fue adquirido en la zona centro de Xalapa con comerciantes locales. Una vez separados de las vísceras, los caparazones fueron transportados al Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada de la Universidad Veracruzana donde se lavaron con agua corriente para remover otros tejidos y excremento. Se colocaron en una estufa de desecación a 100°C y, tras 20 minutos, se molieron en moulinex hasta volverse un fino polvo.

Las unidades experimentales se dividieron en cuatro grupos según un diseño experimental monofactorial: Grupo Q0 (control), con pulpa de café y lombrices; Grupo Q1, con pulpa de café, lombrices y 1 g de PCJ; Grupo Q2, con pulpa de café, lombrices y 2 g de PCJ; Grupo Q3, con pulpa de café, lombrices y 3 g de PCJ. Cada grupo contó con tres réplicas independientes que se distribuyeron completamente al azar y se incubaron a 20°C en total oscuridad (Cuadro 3.1; *vid* anexos).

Cada unidad se tapó con una tapa plástica con seis perforaciones (tamaño de poro de 0.3cm) para permitir el intercambio de gases, evitar evaporación y variaciones bruscas en el contenido de agua. La incubación se llevó a cabo por 42 días tras lo cual se evaluó que los componentes de la lombricomposta fueran completamente indistinguibles para continuar con las pruebas.

#### 4.3.3. Producción de extracto de lombricomposta sin aireación

Al concluir el proceso de lombricompostaje, se llevó a cabo la extracción acuosa de la lombricomposta. Para mantener la independencia obtenida de cada unidad experimental, cada extracto se realizó en frascos estériles por separado, uno por cada unidad experimental de lombricompostaje, previa homogeneización de la lombricomposta. Para realizar esta extracción se utilizaron 5 g de lombricomposta en 25 ml de agua.

La mezcla de lombricomposta y agua desionizada estéril fue agitada manualmente y se incubó durante 24 h. Pasado este tiempo se procedió a la separación del extracto por decantación.

#### 4.3.4. Efecto del ExLom-P con diferentes concentraciones de PCJ en el daño foliar ocasionado por la roya en plantas de café. Primer experimento *in vivo*

Para evaluar la efectividad de los extractos con y sin PCJ, se realizó un experimento monofactorial considerando únicamente la cantidad de quitina aplicada en la lombricomposta de la cual se realizó el respectivo ExLom-P como factor. Es decir, los extractos utilizados en los tratamientos fueron: i)



**Figura 3.2.** Instalación del experimento en invernadero del Jardín Botánico “Francisco Javier Clavijero”. Foto: Marycruz Álvarez J.

ExLom-P Q0, ii) ExLom-P Q1, iii) ExLom-P Q2, iv) ExLom-P Q3; etiqueta derivada de la lombricomposta de donde fueron producidos. Se agregó un grupo control negativo para asegurar la inocuidad del ambiente en donde se instalaron las plantas de café sin inoculación de esporas de roya (NEG) y un grupo control positivo (POS) infectado con esporas en solución de agua (Cuadro 3.2; *vid* anexos).

Para cada tratamiento se prepararon soluciones independientes de esporas, para lo cual se usaron pinzas rectas de precisión (marca Lacor), cuya punta se hundió en la muestra con las esporas y posteriormente las esporas adheridas se suspendieron en frascos de 5ml con 3 ml de los extractos de los diferentes tratamientos.

En resumen, en este experimento se emplearon esporas suspendidas en 3 ml de los siguientes extractos y soluciones:

i) ExLom-P Q0 (extracto sin PCJ), ii) ExLom-P Q1, (extracto con 1 gr de PCJ), iii) ExLom-P Q2, (extracto con 2 gr de PCJ), iv) ExLom-P Q3, (extracto con 3 gr de PCJ), v) Control positivo (POS), agua con

esporas, y vi) Control negativo (NEG), 3 ml de agua. Cabe destacar que en este experimento no se contó con un control del número de esporas por mililitro, detalle que se modificaría en el experimento 2 *in vivo*).

Una vez obtenidas las suspensiones con los diferentes extractos, se procedió a la inoculación manual de esporas a las plantas de café.

Cada tratamiento contó con seis réplicas experimentales consistentes en plantas de café variedad típica de 50 cm de altura provenientes de la localidad de San Marcos, municipio de Xico, Veracruz. Cada unidad fue examinada para comprobar que no tuviera lesiones previas al experimento de infección por roya y fueron incubadas en una membrana de polietileno (bolsa plástica) transparente durante 80 días bajo malla sombra del 50%. Todas contaron con un sustrato de tierra con arena sostenido por una bolsa negra de vivero convencional.

La inoculación se realizó utilizando pinceles. Para cada planta se utilizaron 3 ml de cada solución por cada planta (unidad experimental), dicho volumen fue distribuido en el envés de todas las hojas de la planta ( $32 \pm 10.53$  hojas por unidad experimental).

Después de 80 días de incubación se evaluó el daño foliar a través de la colección de las hojas y medición de sus lesiones. Para ello se removieron todas las hojas de cada unidad experimental y se depositaron en bolsas “ziploc” resellables. Estas hojas fueron digitalizadas en un escáner Hewlett-Packard Deskjet 1510. Una vez digitalizadas las imágenes fueron cargadas en el software ImageJ versión 1.50i, en donde se estimó el área foliar total de cada unidad experimental y el área de lesiones (manchas de color naranja).

#### **4.3.5. Valoración del efecto de ExLom-P estéril-crudo y del tiempo de inoculación de esporas de *H. vastatrix* en el daño foliar de plantas de café. Segundo experimento *in vivo*.**

Para evaluar la importancia de los microorganismos como factor inhibidor del daño foliar ocasionado por la roya, la mitad del ExLom-P obtenido del tratamiento 0Q (sin PCJ) fue esterilizado a temperatura ambiente por filtración a través de un filtro de fibra de vidrio con apertura de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ . Se escogió este método de esterilización debido a que ha sido empleado exitosamente en trabajos similares (Cronin *et al.*, 1996; Dianéz *et al.*, 2006; Raoudha *et al.*, 2009).

Para comprobar la esterilidad del ExLom-P filtrado se realizaron cultivos por triplicado en medio de cultivo Müeller-Hinton, un medio rico en el cual se desarrollan hongos y bacterias permitiendo observar

si la filtración impidió el paso de hongos, bacterias, y/o esporas. Como control positivo se llevaron a cabo inoculaciones en los mismos medios de extracto crudo (sin filtrar). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente en total oscuridad durante 30 días. De estos cultivos se concluyó que la filtración fue efectiva al esterilizar el ExLom-P ya que no se observó el desarrollo de microorganismos durante 30 días desde el sembrado.

Con la certeza de la esterilidad del ExLom-P mediante el método empleado, se continuó con la instalación del segundo experimento *in vivo*, el cual se realizó de forma semejante al primer experimento en plantas de café con algunas modificaciones metodológicas que consistieron en el aumento del número de réplicas a 10 plantas por cada tratamiento y el control de la cantidad de esporas en el inóculo de roya. Así mismo, en este experimento se valoró la presencia y ausencia de microorganismos en el extracto y el efecto del tiempo de inoculación de la solución de esporas y el ExLom.

Para la deposición de esporas se suspendieron esporas en agua,  $5 \pm 0.03$  mg por cada 3 ml, esto es, aproximadamente  $65,000 \pm 4,000$  esporas por cada unidad experimental constatado a través de conteos en cámara de Neubauer. Después de homogeneizar las esporas en agua, mediante pinceladas de la solución en las hojas se llevó a cabo la inoculación de los 3 ml de solución de esporas en 13 hojas de cada una de las plantas de café. Tras cada pincelada se llevó a cabo una nueva homogeneización.

Como se mencionó anteriormente, en este experimento la inoculación de esporas se realizó a diferentes tiempos, lo cual se refiere a la antelación con la que se inoculó la roya respecto de la aplicación del ExLom-P, los tratamientos fueron los siguientes: i) inoculación de esporas cinco horas antes de aplicar el ExLom-P, ii) inoculación de esporas dos horas antes del ExLom-P, iii) inoculación de esporas al mismo tiempo que el ExLom-P y iv) inoculación de esporas dos horas después, lo que implica que el ExLom-P se aplicó primero y dos horas después se inocularon las esporas.

Estos tratamientos fueron etiquetados como +5, +2, 0 y -2, respectivamente. Por su parte, la presencia o ausencia de microorganismos en el extracto se etiquetó como C y F, respectivamente.

En este experimento, las lesiones en las hojas fueron medidas de la misma manera que el ensayo anterior, pero en este experimento se evitó inocular las hojas meristemáticas y las hojas dicotiledónicas. Así, se inocularon 13 hojas por cada unidad experimental.

#### 4.4. Análisis estadísticos

##### 4.4.1. Efecto del ExLom-P adicionado con PCJ en el daño foliar ocasionado por la roya en plantas de café

Para la verificación de normalidad en los datos, se realizó una exploración inicial de datos con la prueba de Shapiro-Wilk de los datos obtenidos al evaluar el área de las lesiones. Al obtener una distribución no paramétrica (Shapiro-Wilk  $P < 0.05$ ) se procedió a transformar la variable a través de un ranking de los datos obtenidos, lo cual permite obtener un vector de datos ordinales para aplicar una prueba paramétrica (Conover e Iman, 1981; Conover, 1999; Aceves-Aparicio *et al.*, 2018). Lo anterior se llevó a cabo con el comando “rank(variable)” en el programa R. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía sobre la variable transformada a un  $\alpha = 0.05$  y una prueba de Tukey a un  $\alpha = 0.05$  para las comparaciones múltiples. Por su parte, las gráficas correspondientes fueron realizadas con datos no transformados.

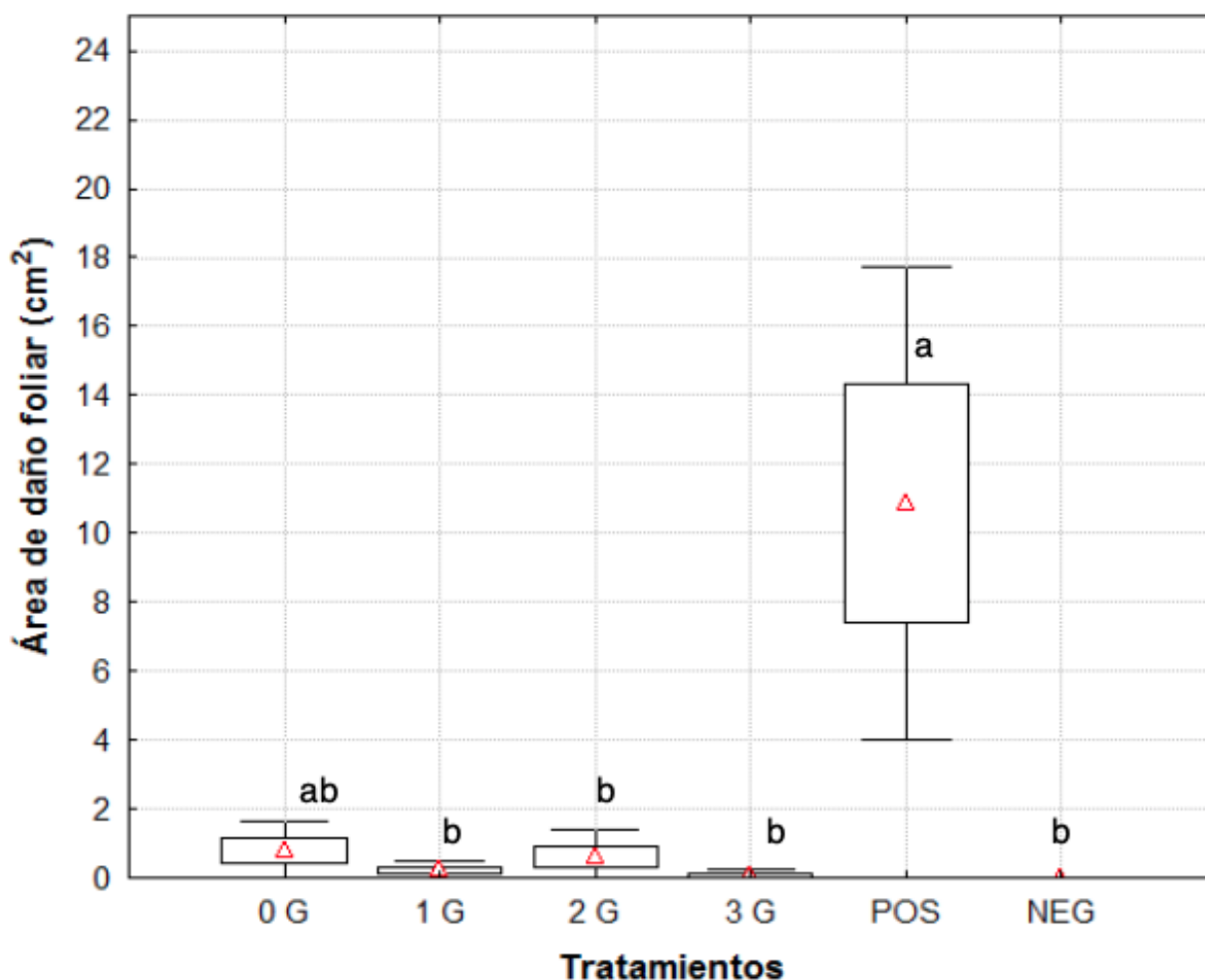
##### 4.4.2. Efecto de los microorganismos del ExLom-P y el tiempo de inoculación de las esporas en el daño foliar de la roya del café

Para la verificación de normalidad en los datos, se realizó una exploración inicial de datos con la prueba de Shapiro-Wilk de los datos obtenidos al evaluar el área de lesión. Al obtener una distribución no paramétrica (Shapiro-Wilk  $P < 0.05$ ) se procedió a transformar la variable a través de un ranking de los datos obtenidos. Posteriormente, para determinar si existía una interacción entre factores, se llevó a cabo un análisis de varianza de dos vías a un  $\alpha = 0.05$  y una prueba de Tukey a un  $\alpha = 0.05$  para las comparaciones múltiples.

## 4.5. Resultados

### 4.5.1. Efecto del ExLom-P con diferentes concentraciones de PCJ en el daño foliar ocasionado por la roya en plantas de café. Primer experimento in vivo

El daño foliar ocasionado por la roya del café a las unidades experimentales fue significativamente diferente entre el control positivo y el tratamiento con extractos ( $[F(391.8, 50.6) = 7.747 (P < 0.0001)]$ , Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Daño foliar ocasionado por *H. vastatrix* en plantas de café después de la aplicación de ExLom-P con y sin PCJ. POS es el control positivo (esporas + agua); NEG es control negativo (sólo agua); 0G (esporas + ExLom-P sin PCJ), 1G (esporas + ExLom-P 1g PCJ), 2G (esporas + ExLom-P 2 g PCJ) y 3G (esporas + ExLom-P 3 g PCJ). En donde la caja presenta el error estándar y los bigotes la desviación.

Todos los tratamientos con ExLom-P disminuyeron el daño foliar ocasionado por *H. vastatrix* ( $P < 0.05$ ) con la excepción del extracto sin quitina (0G), el cual no es significativamente diferente a los tratamientos con PCJ y estuvo muy cerca de ser significativo con una  $P$  marginal de  $P = 0.0623$ .

Este valor  $P$  cercano al valor crítico indica la igualdad estadística pero biológicamente puede interpretarse como una diferencia significativa ya que, disminuye el daño foliar ocasionado por la roya del café. Por lo cual es factible concluir, el daño foliar de la roya disminuirá siempre que se aplique el ExLom-P foliarmente, con una probabilidad de equivocación del 6%.

También se observó que los tratamientos con PCJ fueron iguales entre sí ( $P > 0.05$ ) lo cual indica que la disminución del daño foliar a través del uso de ExLom-P derivado de lombricomposta de pulpa de café no varía significativamente al usar PCJ como fuente de quitina en el rango de 0 a 3 g por cada 400 g de pulpa de café, siendo su adición innecesaria en lo que refiere al control biológico de la roya en las condiciones experimentadas.

Por otro lado, si observamos la incidencia de hojas lesionadas en función del tratamiento (Cuadro 3.4), se tiene que en el control positivo 18 hojas (8% de las hojas expuestas a la roya) desarrollaron manchas cloróticas (de las cuales sólo se muestran 9 en el cuadro 3.4).





De forma consistente con los resultados de daño foliar (Figura 3.4), el tratamiento más cercano al control positivo fue el del ExLom-P sin nutriente suplementario (0Q) en el cual se observaron 12 hojas con lesiones (5.4% del total). Sin embargo, debe recalarse que, a pesar de la cercanía en número de hojas lesionadas, las manchas cloróticas fueron más pequeñas conllevando a la interpretación biológica (antes mencionada) de que, incluso este tratamiento estadísticamente igual al control positivo, disminuye el daño foliar causado por la roya.

En lo que respecta a los ExLom-P 1Q y 2Q sólo se observaron 1 y 3 hojas, 0.6% y 1.4% respectivamente, con lesiones por roya del café. Además, las manchas cloróticas fueron pequeñas. Esto conlleva a que la mayoría de los datos de daño foliar proveídos por las unidades experimentales de estos tratamientos fueran cero (todas las hojas eran verdes). Por tanto, estos extractos fueron muy efectivos (Cuadro 3.4 y Figura 3.4).

En última instancia, el tratamiento más efectivo fue el ExLom-P 3Q que fue estadística y visualmente igual al control negativo, en donde ninguna hoja desarrolló lesiones (Cuadro 3.4).

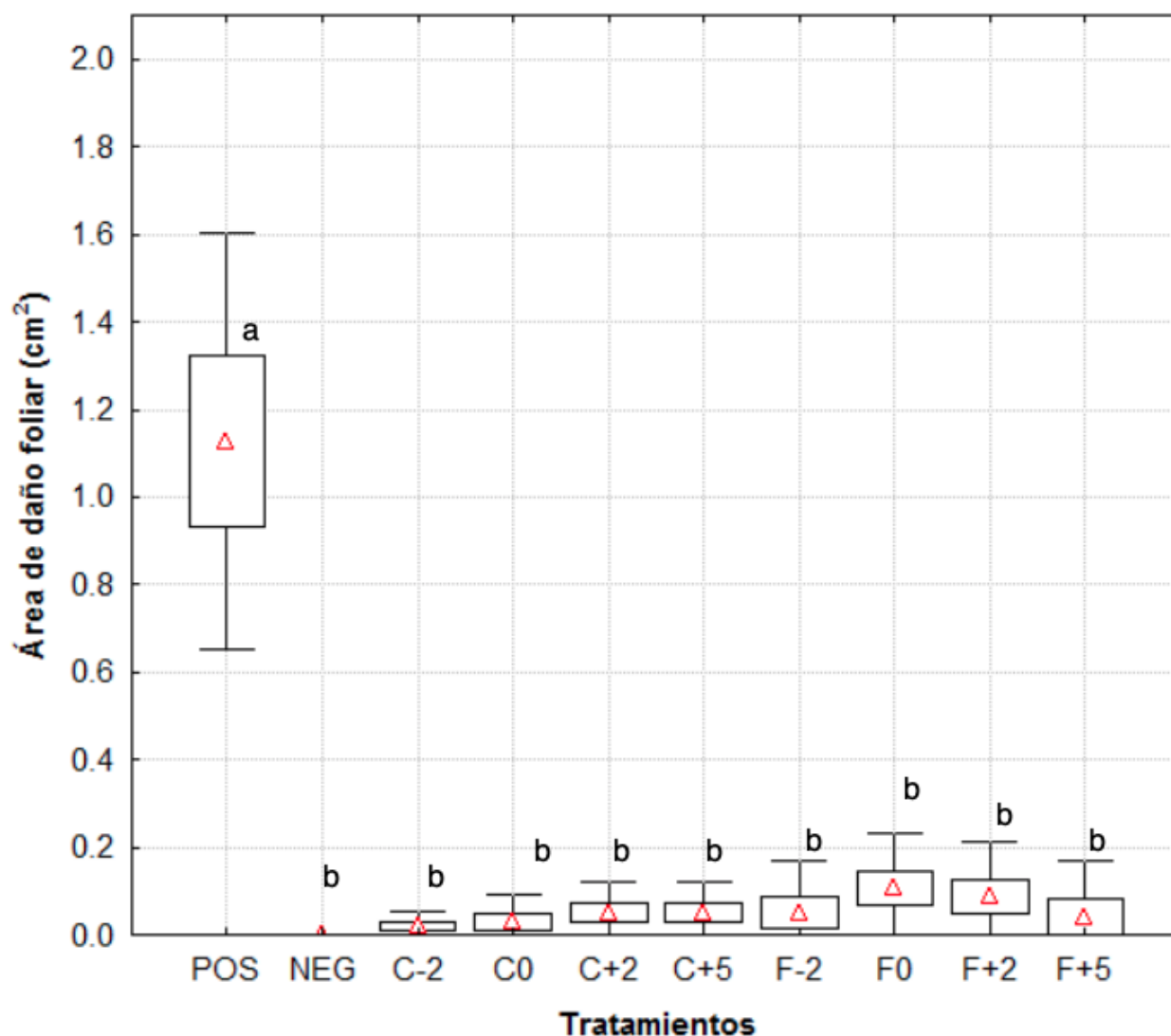


**Cuadro 3.4.** Hojas lesionadas durante el primer experimento *in vivo*. Las hojas presentadas del control positivo y el ExLom-P 0Q fueron seleccionadas a través de un muestreo sistemático, mientras que las hojas del ExLom-P 1Q y 2Q son todas las que desarrollaron lesiones.

Tratamiento	Daño foliar en hojas
<b>Control positivo</b> Se presenta sólo la mitad de hojas lesionadas de 217 hojas observadas	
<b>ExLom-P 0Q</b> Se presenta sólo la mitad de hojas lesionadas 221 hojas observadas	
<b>ExLom-P 1Q</b> Total de hojas lesionadas de 164 hojas observadas	
<b>ExLom-P 2Q</b> Total de hojas lesionadas de 208 hojas observadas	
ExLom-P 3Q	Las plantas con este tratamiento no desarrollaron lesiones
Control negativo	Las plantas con este tratamiento no desarrollaron lesiones

4.5.2. Valoración del efecto de ExLom-P estéril-crudo y del tiempo de inoculación de esporas de *H. Vastatrix* en el daño foliar de plantas de café. Segundo experimento *in vivo*

Al compararse entre sí, los tratamientos con ExLom-P no tuvieron diferencias ( $[F_{(1107, 510)} = 2.172 (P > 0.05)]$ ), esto es, que el hongo desarrolla lesiones iguales sin importar el ExLom-P utilizado (crudo o estéril) o el momento en el que se inocularon las esporas en las hojas.



**Figura 3.4.** Daño foliar en plantas de café (13 hojas por unidad experimental) causado por *H. vastatrix* después de la aplicación de ExLom-P crudo (C) y ExLom-P esterilizado (F). La caja presenta el error estándar y el bigote la desviación estándar.

Todos los tratamientos con ExLom-P disminuyeron el daño en el área foliar respecto del control positivo y fueron estadísticamente iguales al control negativo, mostrando la eficacia del uso del ExLom-P en condiciones de invernadero.










Por su parte, el factor "tiempo de aplicación del ExLom-P" no mostró tener algún efecto en el daño foliar ( $P > 0.05$ ). Todos los grupos fueron iguales al haber presentado un área de daño igual al control negativo. Por consiguiente, se deduce que la aplicación previa o posterior del ExLom-P respecto de la inoculación de las esporas (en el rango de -2 a +5 horas) no tuvo efecto en la disminución del daño foliar.

Es importante destacar que el experimento también mostró que los microorganismos presentes en el ExLom-P no influyen en la producción de áreas foliares dañadas ( $P > 0.05$ ). Lo que indica que el ExLom-P es el factor más importante en la disminución del daño foliar. De acuerdo con los resultados de esta segunda fase, el ExLom-P puede aplicarse dos horas antes o hasta cinco horas después, y aún así disminuirá significativamente el daño foliar de la roya. También puede usarse estéril (filtrado) o en su forma cruda (decantado).

A pesar de la igualdad estadística en relación al área de daño foliar (Figura 3.4), vale la pena mencionar que, al comparar el número de hojas dañadas en los tratamientos de ExLom-P crudo con las hojas dañadas en los tratamientos de ExLom-P filtrado (Cuadro 3.5) en la mayoría de los casos (tiempo cero, más dos y más cinco) el número de hojas dañadas es menor al usar ExLom-P crudo y, para el caso del tiempo menos dos horas, es igual. Esta tendencia también puede observarse en el daño foliar (Figura 3.4), sin embargo, la variabilidad no permitió establecer diferencias significativas al respecto.

Entre estas alternativas de aplicación del ExLom-P, la más cercana al control negativo es el ExLom-P crudo aplicado dos horas antes de la deposición de esporas ( $P > 0.99999$ ). Este patrón se asemeja al observado para el ExLom-P filtrado, el cual al ser aplicado dos horas antes mostró sólo dos hojas infectadas pero con lesiones más grandes, dando lugar a la dispersión de datos (figura 3.5).

**Cuadro 3.5.** Imágenes del total de hojas con lesiones encontradas durante el segundo experimento *in vivo*. Debido a que la severidad de la enfermedad fue menor que en el experimento anterior, se muestran todas las hojas con lesiones (en cada tratamiento se observaron 130 hojas en total).

Tratamiento	Daño foliar en hojas	Daño foliar en hojas	Tratamiento
Control positivo		Las plantas con este tratamiento no desarrollaron lesiones	Control negativo
ExLom-P C-2			ExLom-P F-2
ExLom-P C0			ExLom-P F0
ExLom-P C+2			ExLom-P F+2
ExLom-P C+5			ExLom-P F+5

#### 4.6. Discusión

Al realizar ensayos con el extracto acuoso de composta o lombricomposta en el control de enfermedades normalmente se obtienen resultados positivos, esto es, la disminución del desarrollo de los hongos patógenos (Cuadro 3.6).

El control biológico de enfermedades de plantas a través del uso de extracto de composta o lombricomposta comúnmente es atribuido a la actividad biológica, particularmente a los microorganismos (Kavroulakis *et al.*, 2010; Gurama *et al.*, 2012; Gomez-Brandon *et al.*, 2015). Esto ha sido derivado de diversos experimentos que se han centrado en contrastar los efectos del extracto de composta crudo y el extracto esterilizado a través de membranas de 0.2  $\mu\text{m}$  o autoclaveado. Tal es el caso de El-Masry *et al.*, (2002), Dianéz *et al.*, (2006), Cronin *et al.*, (1996) y Marin *et al.*, (2013) en donde se encontró que para lograr la supresión de las enfermedades debía evitarse la esterilización del extracto. Sin embargo, este trabajo mostró que el ExLom-P puede ser esterilizado (a través de microfiltros) y aún así conservar efecto de disminución del daño de la roya del café en experimentos en vivo.

Aunque poco común, este efecto ha sido reportado anteriormente por Elad y Shtienberg (1994) quienes indicaron que la pasteurización del extracto solo nulifica parcialmente el control de enfermedades y sólo en algunos casos. St. Martin *et al.*, (2012) reportaron la disminución del crecimiento del patógeno *Phytophthora ultimum* a través del uso de un extracto de composta estéril (usando autoclave) derivado de hoja de banana, aserrín, estiércol de vaca, entre otros. Más recientemente Marin *et al.*, (2013) reportaron que el extracto de composta aireado y no-aireado inhiben el crecimiento de *Erysiphe cichoracearum* sin importar si fueron esterilizados por autoclave o por microfiltración. Lo anterior indica que, a pesar de que la generalidad acepta a la actividad microbiológica como un factor fundamental en el control de enfermedades (como lo exponen nuestros resultados de germinación del capítulo 2), existen también extractos cuyas propiedades químicas y bioquímicas (no microbiológicas) disminuyen el desarrollo de hongos patógenos.

Ante esta situación, se recomienda que posteriores estudios continúen describiendo las condiciones óptimas de compostaje o aplicación del extracto que permitan dilucidar en qué casos, particularmente, puede llevarse a cabo una esterilización sin comprometer la calidad del extracto como supresor de enfermedades (como ocurrió en este estudio).

**Cuadro 3.6.** Control biológico de algunos patógenos a través de la aplicación de extracto de composta y lombricomposta.

<b>Método de descomposición</b>	<b>Materia orgánica compostada</b>	<b>Variable de respuesta</b>	<b>Patógeno controlado</b>	<b>Autor</b>
<b>Lombricompostaje</b>	Pulpa de café	Área de daño foliar	<i>Hemileia vastatrix</i>	Este estudio
<b>Compostaje</b>	Desperdicios de uva	Porcentaje de reducción del crecimiento radial de hifas en cajas petri	<i>Rhizoctonia solani</i> , cuatro razas de <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> y <i>Phytophthora parasitica</i>	Dianéz <i>et al.</i> , 2006
<b>Compostaje</b>	Desperdicio de hojas y frutas	Porcentaje de reducción del crecimiento radial de hifas en cajas petri y peso seco	<i>Phythium debaryanum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Sclerotium bataticola</i>	El-Masry <i>et al.</i> , 2002
<b>Compostaje</b>	Sustrato post-cosecha de hongo	Transformación angular del porcentaje de germinación de esporas.	<i>Venturia inaequalis</i>	Cronin <i>et al.</i> , 1996
<b>Composta</b>	Desperdicio de olivos, <i>Posidonia oceanica</i> y estiércol de pollo	Porcentaje de inhibición de crecimiento <i>in vitro</i>	<i>Phytium aphanidermatum</i>	Raoudha <i>et al.</i> , 2009
<b>Compostaje</b>	Hoja de banana, aserrín, estiércol de vaca, entre otros.	Porcentaje de inhibición de crecimiento <i>in vitro</i>	<i>Phytium ultimum</i>	St. Martin <i>et al.</i> , 2012
<b>Compostaje</b>	Desperdicio de fruta y palma de aceite	Porcentaje de daño foliar	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	Naidu <i>et al.</i> , 2013
<b>Lombricompostaje</b>	No reportado	Porcentaje de daño foliar	<i>Podosphaera fusca</i>	Marín <i>et al.</i> , 2013

Parte de la teoría que podría explicar este fenómeno es expuesta por Puga-Freitas y Blouin (2014) quienes exponen que los suelos contienen una gran diversidad de moléculas que semejan a aquellas fitohormonas producidas por las plantas. Como se expuso en el capítulo anterior, el ExLom-P contiene ácido jasmónico, un promotor de defensas metabólicas (Puga-Freitas *et al.*, 2012) y ácido abscísico, una molécula relacionada a la tolerancia del estrés biótico (Audesirk, 2017). Así estas moléculas podrían estar interactuando en tiempo real con la planta de café activando complejos sistemas de defensa y, así, llevándola a evitar el daño causado por *H. vastatrix* (Stintzi *et al.*, 2001).

Es importante recalcar que, además de las fitohormonas citadas, el ExLom-P también presentó cuatro compuestos fenólicos cuyas propiedades antifúngicas podrían relacionarse con los resultados obtenidos en el experimento dos. Entre estos compuestos se destacan: el ácido 4-hidroxibenzoico, con probados efectos antifúngicos (Kosová *et al.*, 2015); el ácido 4-hidroxifenilacético, antibiótico producido por bacterias de rizósfera (Lee *et al.*, 2013); Vainilina, utilizada en la eliminación de patógenos de frutas y vegetales (Bezerra *et al.*, 2017) y el ácido trans-cinámico, metabolito microbiano tóxico para hongos fitopatógenos (Hazir *et al.*, 2017).

En este trabajo también se observó que al agregar un nutriente suplementario al proceso de lombricompostaje (PCJ) se obtuvo una disminución estadísticamente significativa del daño foliar de *H. vastatrix*. Sin embargo, este resultado se obtuvo también sin agregar PCJ en el segundo experimento. Por ello, en concordancia con lo concluido en el capítulo anterior, las concentraciones probadas de PCJ no se recomiendan como nutriente adicional en la producción de lombricomposta para generación de ExLom-P. Lo anterior porque, además de los resultados negativos discutidos en el capítulo 2 (la disminución de supervivencia de lombrices, la insignificancia en el aumento de la actividad enzimática y su irrelevancia en el índice de germinación de esporas de *H. vastatrix*) las tres dosis añadidas de PCJ no tuvieron efectos positivos en la disminución del área de daño foliar causado por *H. vastatrix*. Por consiguiente, su adición en dichas concentraciones no es recomendable.

Los resultados de incidencia aquí mostrados (número de hojas con lesiones) se asemejan a los reportados por Capucho *et al.* (2013), quienes, al utilizar diversos fungicidas químicos, encontraron que la incidencia de la enfermedad podría ser igual o disminuir hasta en un 70% respecto del tratamiento control. En este estudio, para el caso del primer experimento, el mejor tratamiento (ExLom-P 3Q) disminuyó en un 100% la incidencia de roya en las unidades experimentales mientras que, en el segundo, los mejores tratamientos (ExLom-P -2, ExLom-P 0, ExLom-P +2 y ExLom-P F-2)

disminuyeron la incidencia en un 83.34% respecto del control, por lo que pueden considerarse alternativas prometedoras para el control biológico de la roya del café. Debe recalcar que estos resultados podrían variar en campo, Capucho *et al.*, (2013) llevaron a cabo sus ensayos en parcelas expuestas a las variables ambientales, por lo que sus conclusiones se acercan más al efecto real de los fungicidas en el control de la roya.

Por su parte, el tiempo de la inoculación del ExLom-P antes y después de la inoculación de las esporas, tampoco tuvo significancia en la intensidad del área de lesiones reportadas en este trabajo. El tiempo máximo de “ventaja” dado a la espора de roya antes de aplicar los ExLom-Ps fueron cinco horas, suficiente para la germinación y penetración en el estoma (formación del apresorio; Secretaría de Ganadería Pesca y Agricultura [SAGARPA], 2016). A pesar de contar con este periodo, el daño foliar no se mostró diferente de los otros tratamientos llevados a cabo con pretratamiento o tratamiento inmediato.

#### **4.7. Conclusiones**

La aplicación foliar del ExLom-P disminuyó significativamente el daño ocasionado por *H. vastatrix* sin importar si se agrega PCJ como nutriente suplementario o no. Por ende, la adición de esta fuente de quitina no es recomendada, al menos en las dosis empleadas en el presente estudio. El ExLom-P también se mostró eficaz en la disminución del daño foliar aún al ser esterilizado a través de microfiltración por lo que, bajo las condiciones experimentadas, el factor microbiano tampoco es relevante para evitar el daño causado por *H. vastatrix* en hojas de café. Estos antecedentes realzan la importancia de los compuestos bioquímicos que se encuentran en el ExLom-P, muchos de los cuales aún no se han identificado plenamente y cuyos mecanismos de acción en las plantas son desconocidos.

#### **4.8. Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado y al Inecol por el apoyo instrumental e institucional. Así mismo a los investigadores del Instituto de Ecología, A. C. e Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA) cuya experiencia guió el presente trabajo a sus resultados expuestos.

Agradezco también el trabajo técnico y entusiasmo de la bióloga Marycruz Álvarez J. quien con sus ideas y fotografías mejoró de forma importante el contenido de este trabajo.



#### 4.9. Referencias

- Aceves-Aparicio A, Tapia-McClung H, Macías-Ordoñez R, Rao D (2018) Subsocial spiders in space and time: A fine scale approach to the dynamics of dispersal. *Ethology* 124(7):1 - 10
- Audesirk T (2017) Biology. Life on earth with physiology. 9ª edición. Pearson Education.
- Avelino J, Zelaya H, Merlo A, Pineda A, Ordoñez M, Savery S (2006) The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. *Ecological Modelling* 197(3-4):431 - 447
- Bezerra CF, Camilo CJ, Silva MKN, de Freitas TS, Ribeiro-Filho J, Coutinho HDM (2017) Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria. *Microbial pathogenesis* 113:265 - 268
- Capistrán F, Aranda E, Romero JC (2001) Manual de reciclaje, compostaje y lombricompostaje. 1ª edición. Editorial Instituto de Ecología, A. C. Mexico.
- Capucho AS, Zambolim L, Lopes UN, Milagres NS (2013) Chemical control of coffee leaf rust in *Coffea canephora* cv. conilon. *Australasian Plant Pathology* 42(6):667 – 673
- Conover WJ, Iman RL (1981) Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician* 35(3):124 - 129
- Conover WJ (1999) Some methods based on ranks. 3ª edición. Editorial John Wiley & Sons Inc. Estados Unidos de América.
- Cronin MJ, Yohalem DS, Harris RF, Andrews JH (1996) Putative mechanism and dynamics of inhibition of the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* by compost extracts. *Soil biology and biochemistry* 28(9):1241 – 1249
- Dianéz F, Santos M, Boix A, de Cara M, Trillas I, Avilés M, Tello JC (2006) Grape marc compost tea suppressiveness to plant pathogenic fungi: Role of siderophores. *Compost science and utilization* 14(1):48 - 53
- Dianéz F, Santos M, Tello JC (2007) Suppressive effects of grape marc compost on phytopathogenic oomycetes. *Archives of phytopathology and plant protection* 40(1):1 - 18
- El-Masry MH, Khalil AI, Hassouna MS, Ibrahim HAH (2002) *In situ* and *in vitro* suppressive effect of agricultural composts and their water extracts on some phytopathogenic fungi. *World journal of microbiology and biotechnology* 18(6):551 - 558

- Elad Y, Shtienberg D (1994) Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Crop protection* 13(2):109 - 114
- Food and Agriculture Organization [FAO] (2015) Agricultural Production Statistics. FAO, Roma.  
Recuperado de <http://faostat3.fao.org/search/coffee/>
- Gómez-Brandon M, Vela M, Martínez-Toledo MV, Insam H, Domínguez J (2015) Effects of compost and vermicompost teas as organic fertilisers. Capítulo en: Sinha S, Pant KK, Bajpai S. *Advances in Fertiliser Technology: Synthesis* (Vol. 1). Editorial Studium Press.
- Gurama AU, Haruna SG, Adebitan SA (2012) Characteristics and anti fungal effect of composts on *Fusarium oxysporum* F. SP. *lycopersici* incitant of *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of biodiversity and environmental sciences* 2(7):23 - 31
- Hazir S, Shapiro-Ilan DI, Bock CH, Leite LG (2017) Trans-cinnamic acid and *Xenorhabdus szentirmaii* metabolites synergize the potency of some comercial fungicides. *Journal of Invertebrate Pathology* 145:1 - 8
- Hein L, Gatzweiler F (2006) The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. *Ecological Economics* 60(1):176 - 185
- Kavroulakis N, Ntougias S, Besi MI, Katsou P, Damaskinou A, Ehaliotis C, Zervakis GI, Papadopoulou KK (2010) Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant soil* 333(1-2):233 - 247
- Kosová M, Hrádková I, Mátlová V, Kadlec D, Smidrkal J, Filip V (2015) Antimicrobial effect of 4-hydroxibenzoic acid ester with glycerol. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 40(4):436 - 440
- Lee YS, Anees M, Hyun HN, Kim KY (2013) Biocontrol potential of *Lysobacter antibioticus* HS124 against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, causing disease in tomato. *Nematology* 15(5):545 - 555
- Manson RH, Hernández-Ortíz V, Gallina S, Mehltreter K (eds) (2008) Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz. Biodiversidad, manejo y conservación. 1ª edición. Editorial Instituto de Ecología A. C. e Instituto Nacional de Ecología. México.

- Marin F, Santos M, Dianéz F, Carretero F, Geam FJ, Yau JA, Navarro J (2013) Characters of compost teas from different sources and their suppressive effect on fungal phytopathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(8):1371 - 1382
- Naidu Y, Meon S, Siddiqui Y (2013) Foliar application of microbial-enriched compost tea enhances growth, yield and quality of muskmelon (*Cucumis melo* L.) cultivated under fertigation system. *Scientia Horticulturae* 159:33 - 40
- Poulsen PHB, Moller J, Magid J (2008) Determination of a relationship between chitin's activity and microbial diversity in chitin amended compost. *Bioresource technology* 99(10):4355 - 4359
- Puga-Freitas R, Blouin M (2014) A review of the effects of soil organisms on plant hormone signaling pathways. *Environmental and experimental botany* 114:104 - 116
- Puga-Freitas R, Barot S, Taconnat L, Renou JP, Blouin M (2012) Signal molecules mediate the impact of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* on growth, Development and defence of the plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7(12):10
- Raoudha KBJ, Rabiaa H, Mohamed AT, Jean-Jaques G, Khaled H, Mohamed BK, Belgacem H (2009) Compost, compost extracts and bacterial suppressive action on *Pythium aphanidermatum* in tomato. *Pakistan Journal of Botany* 41(1):315 - 327
- SAGARPA (2016) Roya del cafeto. *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome. Ficha técnica no. 40. Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. México.
- St. Martin C, Dorinvil W, Brathwaite R, Ramsubhag A (2012) Effects and relationship of compost type, aeration and brewing time on compost tea properties, efficacy against *Pythium ultimum*, phytotoxicity and potential as a nutrient amendment for seedling production. *Biological Agriculture and Horticulture* 28(3):23
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer E (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(22):12837 - 12842

## Anexo 1. Cuadros capítulo 3

**Cuadro 3.1.** Diseño de etapa de lombricompostaje para mantener independencia de resultados.

Experimento de lombricompostaje			
Diseño	Completamente al azar	No. de réplicas por tratamiento	3
Factores	Cantidad de quitina	No. de unidades experimentales	12
Niveles de factor	Cero, uno, dos y tres gramos de CJ	Variables de respuesta	Lombricomposta para posteriores pruebas
Tratamientos	4		

**Cuadro 3.2.** Primer experimento en condiciones de invernadero que verifica el efecto de agregar un nutriente complementario a la lombricomposta en el daño foliar de la roya del café.

Experimento in vivo “efecto del ExLom en el daño foliar de la roya del café”			
Diseño	Completamente al azar	No. de réplicas por tratamiento	6
Factores	Cantidad de quitina	No. de unidades experimentales	36
Niveles de factor	Cero, uno, dos y tres gramos y control positivo y negativo	Variables de respuesta	Área de daño foliar
Tratamientos	6		

**Cuadro 3.3.** Resumen del diseño del segundo experimento en condiciones de invernadero que verifica el efecto de remover los microorganismos del extracto y dar tratamiento a diferentes momentos en relación con la deposición de esporas en el daño foliar de la roya del café.

Experimento in vivo “efecto de los microorganismos del ExLom y el tiempo de deposición en el daño foliar de la roya del café”			
Diseño	Completamente al azar	No. de réplicas por tratamiento	10
Factores	Microorganismos y tiempo de deposición	No. de unidades experimentales	100
Niveles de factor	Crudo y filtrado; +5, +2, 0, -2 y controles positivo y negativo	Variables de respuesta	Área de daño foliar
Tratamientos	10		



## 5. Conclusiones generales

El ExLom-P cuya finalidad sea la disminución de la germinación de esporas o del daño foliar de la roya, puede ser producido a través del aprovechamiento de pulpa de café al generar lombricomposta con *Eisenia foetida*, *Eisenia andrei* y *Perionyx excavatus* con una densidad poblacional de 5,000 individuos m<sup>-2</sup>. Este cultivo proporciona lombricomposta en 42 días la cual puede someterse a extracción acuosa (en una relación 1:5 peso de lombricomposta:volumen de agua) que requiere un día de incubación sin necesidad de aireación. El ExLom-P generado puede separarse por medio de decantación y, de acuerdo a las observaciones realizadas en esta investigación, disminuirá la germinación de esporas de roya y, al aplicarse foliarmente, también disminuye el daño foliar. De hecho, este efecto podría replicarse en otras especies de hongos patógenos de plantas ya que el ExLom-P contiene ácido jasmónico (fitohormona que induce resistencia sistémica en las plantas contra patógenos) y diversos compuestos fenólicos con probados efectos antifúngicos y antimicrobianos.

La presencia del ácido jasmónico puede ser la razón de que el ExLom-P disminuyera el daño foliar *in vivo* aún tras haber sido esterilizado a través de microfiltros. Esto a pesar de la evidencia *in vitro* que apoyó fuertemente la hipótesis de que los microorganismos son el factor principal para disminuir la germinación de esporas de roya.

Cabe destacar, que el ExLom-P producido a través de este método también ofrece nutrientes minerales que, por sus concentraciones, podrían ayudar en la nutrición de cultivos como el trigo, rábano, rúcula y chícharo. Además, el ExLom-P también contiene ácido abscísico, una fitohormona que coadyuva a la maduración de embriones y crecimiento vegetativo. Por tanto, el ExLom-P, además de ser un potencial antifúngico de la roya, puede ser un fertilizante foliar.

## 6. Perspectivas

Debe recordarse que el efecto del ExLom-P no se comprobó en campo, únicamente a nivel de invernadero bajo condiciones controladas y los bioensayos de germinación se llevaron a cabo en matrices líquidas de 3 ml. Por tanto, es recomendable escalar los experimentos realizados en este trabajo de investigación. Esto es, obtener volúmenes mayores de ExLom-P, probarlos en unidades experimentales de mayor tamaño (e.g. plantas adultas productivas de café) e incluir variables ambientales en fincas de producción. De replicarse exitosamente los resultados de este trabajo, el ExLom-P podría representar una alternativa viable, barata y regional para la disminución del impacto que tiene la roya en la industria del café.